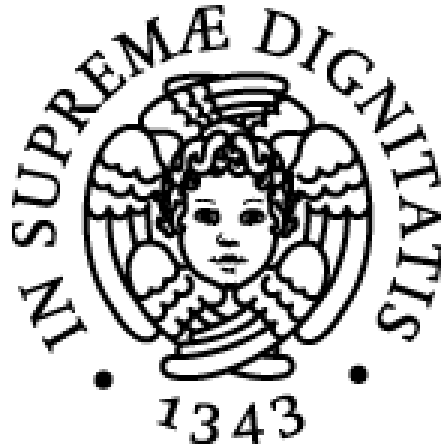


UNIVERSITA' DI PISA



Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

Effetto di eventi estremi di temperatura e deposizione di sedimento sul biofilm di costa rocciosa.

Relatori:

Prof. Lisandro Benedetti-Cecchi

Dott.ssa Martina Dal Bello

Candidato:

Letizia Borelli

INDICE

RIASSUNTO.....	3
ABSTRACT.....	6
INTRODUZIONE.....	8
Cambiamenti climatici globali.....	8
Una nuova generazione di esperimenti sui cambiamenti climatici.....	10
Definizione di evento estremo.....	10
Stato dell'arte.....	13
Sistema di studio.....	15
Scopo del lavoro di tesi.....	18
MATERIALI E METODI.....	21
Sito di studio.....	21
Disegno sperimentale.....	21
Raccolta dati.....	24
Analisi.....	27
RISULTATI.....	29
Biomassa del MPB.....	29
Abbondanza degli erbivori.....	41
DISCUSSIONE.....	42
BIBLIOGRAFIA.....	48

RIASSUNTO

Uno degli aspetti più noti del cambiamento climatico globale è quello legato all'incremento dei valori medi di temperatura (dell'aria e degli oceani), della concentrazione di CO₂ atmosferica e dell'incidenza di precipitazioni intense. Tuttavia, parallelamente alle variazioni nei valori medi delle variabili ambientali, si registra un aumento nella frequenza e nell'intensità degli eventi climatici estremi. Essi sono definiti come eventi climatici inusuali, o statisticamente rari, in grado di alterare le funzioni e/o la struttura di un ecosistema in un modo ben al di fuori di quello che è considerato tipico o normale variabilità. Convenzionalmente, si considera raro un evento che probabilisticamente si verifica una volta ogni cento anni. Gli eventi estremi sono importanti dal punto di vista ecologico perché, alterando la fisiologia degli organismi e/o inducendo episodi di mortalità, possono influenzare in maniera consistente la dinamica delle comunità esistenti. Alla luce di ciò, non sorprende che negli ultimi anni il numero di studi sperimentali volti a testare gli effetti di eventi estremi sia considerevolmente aumentato. Tuttavia, questi esperimenti sono stati effettuati prevalentemente in ambiente terrestre mentre studi analoghi non sono stati ancora condotti in ambiente marino. Inoltre, pochi studi hanno valutato gli effetti di cambiamenti nella distribuzione temporale di eventi estremi.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in questo contesto e ha previsto l'allestimento di un esperimento in cui sono stati simulati gli effetti di due tipologie di eventi estremi (aumento della temperatura dell'aria e della deposizione di sedimento a seguito di intense precipitazioni) sul microfitobenthos epilitico di costa rocciosa. L'esperimento ha previsto anche la manipolazione della frequenza e dell'ordine temporale degli eventi.

Il microfitobenthos è costituito principalmente da organismi fotosintetici come cianobatteri, diatomee e propaguli di macroalghe. La sua abbondanza è regolata da fattori

biologici, come l'attività di pascolo esercitata dagli erbivori, e da fattori abiotici, principalmente temperatura ed insolazione, grado di umettamento e disponibilità di nutrienti. Alla luce di ciò, è probabile che tali popolamenti risultino particolarmente suscettibili a cambiamenti nell'intensità e nella distribuzione temporale di eventi estremi di temperatura e precipitazione atmosferica.

L'esperimento, condotto lungo la costa di Calafuria, a sud di Livorno, è stato ripetuto due volte. L'aumento della temperatura dell'aria è stato ottenuto tramite l'utilizzo di camere in alluminio equipaggiate con stufe a butano (camere riscaldanti), mentre l'aggiunta di sedimento sul substrato ha permesso di simulare un aumento della deposizione di sedimento. Il disegno sperimentale è costituito da 4 fattori: grado di separazione temporale (2 livelli: eventi lontani vs. ravvicinati), identità del primo evento (2 livelli: riscaldamento vs. deposizione di sedimento), identità del secondo evento (2 livelli: uguale vs. diverso dal primo evento) e *plot* (3 livelli). Ciascun *plot* è costituito da un'area di substrato di 40x40 cm. I primi tre fattori sono fissi e incrociati tra loro, mentre il fattore *plot* è *random* e gerarchizzato nella combinazione degli altri tre. Sono stati aggiunti 6 *plot* come controllo artefatto, per quanto riguarda l'utilizzo di camere riscaldanti, e 3 di controllo, per un totale di 33 *plot*. Tale disegno sperimentale ha permesso di testare l'ipotesi secondo cui la concomitanza temporale di temperature estreme dell'aria ed elevata deposizione di sedimento dovrebbe esercitare effetti più severi sul microfitobenthos rispetto a quelli dovuti al verificarsi degli stessi estremi durante un periodo di tempo prolungato.

I risultati del presente lavoro di tesi evidenziano l'importanza del grado di aggregazione temporale sulla risposta del MPB all'incidenza di eventi estremi di temperatura e deposizione di sedimento. In particolare, l'ipotesi secondo cui la concomitanza di eventi estremi produce gli effetti maggiori sulla biomassa del

microfitobenthos è supportata quando il popolamento microfitobentonico recupera nel tempo intercorso tra due eventi distanti nel tempo. Al contrario, quando il recupero è rallentato, in questo caso dall'attività di pascolo delle littorine, sono gli eventi distanti ad avere gli impatti maggiori sul biofilm.

In conclusione, i risultati di tale studio forniscono evidenza empirica della maggiore suscettibilità di popolamenti con elevati tassi di crescita all'aumento nella frequenza e nel grado di aggregazione temporale di eventi estremi e mostrano come, tuttavia, le risposte a tali cambiamenti nella distribuzione temporale degli eventi di disturbo possano essere modulate da fattori biotici.

ABSTRACT

Nowadays, increasing of temperature's mean values, of CO₂ atmospheric concentration and of mean precipitation is an important aspect of global change. Besides changes in trends of these variables, the intensity and the frequency of extreme climatic events are rising. An extreme climatic event is defined as an episode in which a statistically rare or unusual climatic condition alters ecosystem structure and/or function well outside the bounds of what is consider typical or normal variability. Conventionally, an extreme event is an episode that occurs once on 100 years.

Climatic extreme events are likely to cause large impacts on individuals and natural systems. Despite the increasing attention on this topic, our understanding of the compounded effects of multiple extreme events is limited.

During my thesis I focused on the occurrence of extreme episodes of warming and sediment deposition following runoff due to heavy rains on rocky shore epilithic microphytobenthos (EMPB). EMPB is composed of photosynthetic organisms as cyanobacteria, diatoms and macroalgal spores. EMPB abundance is regulated by biotic factors, like grazing, and abiotic factors, for examples substratum humidity, solar radiation, nutrient availability and temperature. Therefore it is possible that EMPB will be affected by extreme events of runoff and warming.

Through a field experiment, I tested the general hypothesis that the concomitance of distinct environmental extreme events elicits larger effects compared to the expected cumulative effect of in- dividual extreme events. The experiment, along Calafuria coast, consisted in the manipulation of four factors: degree of clustering (clustered vs. non-clustered, fixed), type of first event (enhanced sediment deposition vs. increased temperature, fixed), type of second event (enhanced sediment and increased temperature, fixed) and plot (three levels, random). The three fixed factors were crossed to each other,

whereas plot was nested within each combination of levels of the other factors. I simulated the increase of air temperature using aluminium heating chambers equipped with butane stoves, while an enhanced sediment deposition on the substratum was used to simulate the runoff caused by heavy precipitations. The experiment was repeated twice.

Results show that temporal clustering was the most important factor, but the direction of its effect differed between experiments. In the first trial, extreme events had the largest impact on EMPB biomass in the clustered than the non-clustered scenario, whereas the opposite occurred in the second trial. EMPB had recovered completely from the first ECE of the non-clustered scenario in the first experiment, whereas recovery was much slower in the second one. Slower recovery was likely caused by intense grazing from littorinids, increasing the susceptibility of EMPB to non-clustered perturbations in the second experiment. These results suggest that increasing frequency of extreme events may be more detrimental for populations with high recovery rates, and show how biological processes can modulate the compounded effects of multiple perturbations.

1 INTRODUZIONE

1.1 Cambiamenti climatici globali

Al giorno d'oggi l'impatto antropico sul sistema climatico è riconosciuto a scala globale ed attualmente i livelli d'emissioni di gas serra dovuti ad attività antropiche sono i più elevati della storia. I recenti cambiamenti climatici hanno avuto un forte e diffuso impatto sia su i sistemi naturali che su quelli umani.

Secondo quanto riportato nel quinto rapporto di valutazione dell'*International Panel on Climate Change* (IPCC 2013), durante il ventesimo secolo, la temperatura superficiale media è aumentata di $0.74 \pm 0.18^{\circ}\text{C}$. Una buona percentuale dell'incremento osservato è dovuto all'aumento della concentrazione dei gas serra (anidride carbonica, metano e monossido di azoto), che sono il risultato di attività umane come l'impiego di combustibili fossili, la deforestazione e l'urbanizzazione. Inoltre, le proiezioni dei modelli climatici indicano che la temperatura media globale è, probabilmente, destinata a crescere ulteriormente da $1,1^{\circ}\text{C}$ a $6,4^{\circ}\text{C}$ durante il ventunesimo secolo.

A partire dai primi anni del secolo scorso, le precipitazioni sulla superficie terrestre sono aumentate alle medie ed elevate latitudini. Tuttavia, mostrano un decremento nell'area del Mar Mediterraneo e in alcune regioni tropicali e sub-tropicali (Easterling et al 2000). Dato che la capacità del comparto atmosferico di trattenere acqua sta crescendo in modo quasi esponenziale con l'aumentare delle temperature, è possibile che il riscaldamento globale, dovuto per la maggior parte all'impatto antropico, possa essere almeno in parte responsabile dell'incremento delle precipitazioni intense (Minn et al. 2011).

L'incremento della temperatura atmosferica ha portato ad un aumento di quella degli oceani: le acque profonde e quelle superficiali si sono riscaldate con tasso di 0.2 e 0.5 W/m^2 , rispettivamente (Levitus et al. 2005, Ishi et al. 2006). Il riscaldamento delle acque

oceaniche è iniziato nella prima metà del diciannovesimo secolo determinando ingenti cambiamenti nel bilancio energetico terrestre. Questo si è tradotto in cambiamenti nel livello del mare (Cazenave e Nerem 2004) e nella sua salinità (Boyer et al. 2005).

Parallelamente alle variazioni nei valori medi delle variabili ambientali, si registra un aumento nella frequenza e nell'intensità degli eventi climatici estremi (IPCC 2013).

Studi effettuati in varie zone del mondo mostrano come *trend* generale una diminuzione dei giorni freddi (Easterling et al, 2000). In particolare, si registra un aumento statisticamente significativo del numero di notti calde e una riduzione delle notti fredde. Le stesse variazioni significative di temperatura vengono registrate anche per le ore diurne nella maggior parte del globo (IPCC 2013).

Parallelamente a un aumento nella frequenza di giorni particolarmente caldi, si registra un'intensificazione di quelle che vengono definite “ondate di calore”. Le ondate di calore sono periodi di alcuni giorni in cui la temperatura si mantiene costantemente al di sopra delle medie stagionali (IPCC 2013). In base a quanto riportato nell'IPCC, i pochi modelli disponibili in letteratura per prevedere le variazioni degli estremi di temperatura proiettano generalmente uno scenario in cui avremo un evidente decremento dei periodi freddi in un quadro climatico in costante riscaldamento. In questo contesto i valori estremi di temperatura aumenteranno a un tasso maggiore rispetto a quelli medi e probabilmente le ondate di calore saranno più intense, più frequenti e più durature in molte regioni della terra.

Per quanto riguarda gli episodi di intense precipitazioni, essi variano ad un tasso maggiore e non proporzionale ai *trend* mostrati dalle medie annuali (Easterling et al., 2000). Inoltre, le fluttuazioni nelle precipitazioni sono meno coerenti da un punto di vista spaziale e temporale rispetto alle variazioni registrate nelle temperature (Alexander et al., 2006) e di conseguenza risultano più difficili da rilevare. Tuttavia, per il futuro, i modelli

prevedono un possibile aumento generalizzato dei giorni di precipitazioni intense, anche per alcune regioni in cui è previsto un calo delle precipitazioni annue come l'Asia occidentale, la costa occidentale del Sud America e il sud Africa (Zhang et al., 2008).

Per quanto riguarda il bacino Mediterraneo, numerosi studi (ad esempio Moberg et al., 2006) hanno evidenziato un aumento nella durata dei periodi di siccità interrotti da precipitazioni intense, nonostante una elevata variabilità sembri offuscare il recente aumento delle temperature (Camuffo et al., 2010). Le ondate di calore hanno subito un incremento nella durata, nell'intensità e nella frequenza dal 1960 al 2006 e contemporaneamente è stata registrata una variazione negli estremi di temperatura, come ad esempio una diminuzione delle notti fredde (Kuglitsch et al 2009), un aumento di giorni caldi ($T > 30^{\circ}\text{C}$) e di notti tropicali ($T > 20^{\circ}\text{C}$) (Giannakopoulos et al., 2009).

1.2 Una nuova generazione di esperimenti sui cambiamenti climatici

La maggior parte degli studi volti ad analizzare la risposta delle popolazioni naturali ai cambiamenti climatici si è concentrata sugli effetti dei cambiamenti nei valori medi delle variabili ambientali (Blake and Duffy, 2010). Tuttavia, in anni recenti, man mano che cresceva la consapevolezza riguardo al ruolo degli eventi estremi, ambientali e/o climatici, come “driver” dei cambiamenti osservati nelle comunità naturali, il numero di studi focalizzati su di essi è aumentato drasticamente (Jentsch et al. 2007). Prima di fare un breve excursus su quello che è la recente letteratura sugli eventi estremi, è bene puntualizzare come essi vengono definiti e come vengono rilevati all'interno delle serie temporali relative a variabili ambientali.

1.2.1 Definizione di evento estremo

Nel corso degli ultimi anni sono state enunciate diverse definizioni di evento estremo, alcune (e.g. Gutschick and Bassirirad 2003) incentrate sulla risposta degli organismi, altre sulla rarità ed eccezionalità dell'evento climatico o ambientale (e.g. quelle fornite

dall'IPCC 2013). Nel primo caso, un evento estremo, climatico o di altra natura, viene definito come un episodio per cui le abilità di un organismo o di una popolazione di adattarsi ai cambiamenti avvenuti sono sostanzialmente superate, e per il quale gli effetti sugli organismi permangono anche dopo il verificarsi dell'evento (Gutschick and Bassirirad 2003). L'altro approccio, invece, prende in considerazione la rarità di un evento estremo, la quale viene definita utilizzando valori soglia. Generalmente vengono considerati estremi quegli eventi che presentano una probabilità di verificarsi inferiore al 10, al 5 o al 1% in un determinato lasso temporale.

Smith (2011) afferma che un evento climatico estremo può essere considerato come un evento climatico inusuale, o statisticamente raro, in grado di alterare le funzioni e/o la struttura di un ecosistema in un modo ben al di fuori di ciò che è considerato tipico o normale variabilità. Questa definizione integra sia la "causa" (la probabilità con cui l'evento si manifesta), sia la "risposta" (gli effetti acuti e persistenti sui singoli organismi e sulle popolazioni).

Nel quadro attuale dei cambiamenti climatici globali anche la probabilità con cui possiamo assistere al manifestarsi di un estremo episodio di questo tipo può variare. Infatti, le distribuzioni delle variabili climatiche possono cambiare in vario modo, ad esempio, possiamo assistere ad un semplice *shift* della media in una direzione, ad un aumento della variabilità o, ancora, ad un mutamento nella forma della distribuzione (IPCC 2013). In futuro i cambiamenti climatici a cui stiamo assistendo potrebbero portare a condizioni ambientali diverse da quelle odierne, ma comunque stabili. Episodi che oggi sono definiti estremi potranno non essere considerati tali nonostante gli stessi effetti deleteri su organismi, popolazioni e sistemi ambientali (Smith 2011) (Fig.3.1).

Rilevare un evento climatico estremo presenta notevoli difficoltà dal momento che essi avvengono raramente e quindi sono necessarie serie temporali di variabili ambientali

molto estese per poter stimare l'intensità e la frequenza con cui essi si manifestano (Easterling et al. 2000). Tuttavia, costruire tali serie temporali a scala globale risulta, ad oggi, molto difficile a causa della mancanza di dati per molte regioni e per disomogeneità nelle modalità di misura e risoluzione dei dati (Easterling et al. 2000).

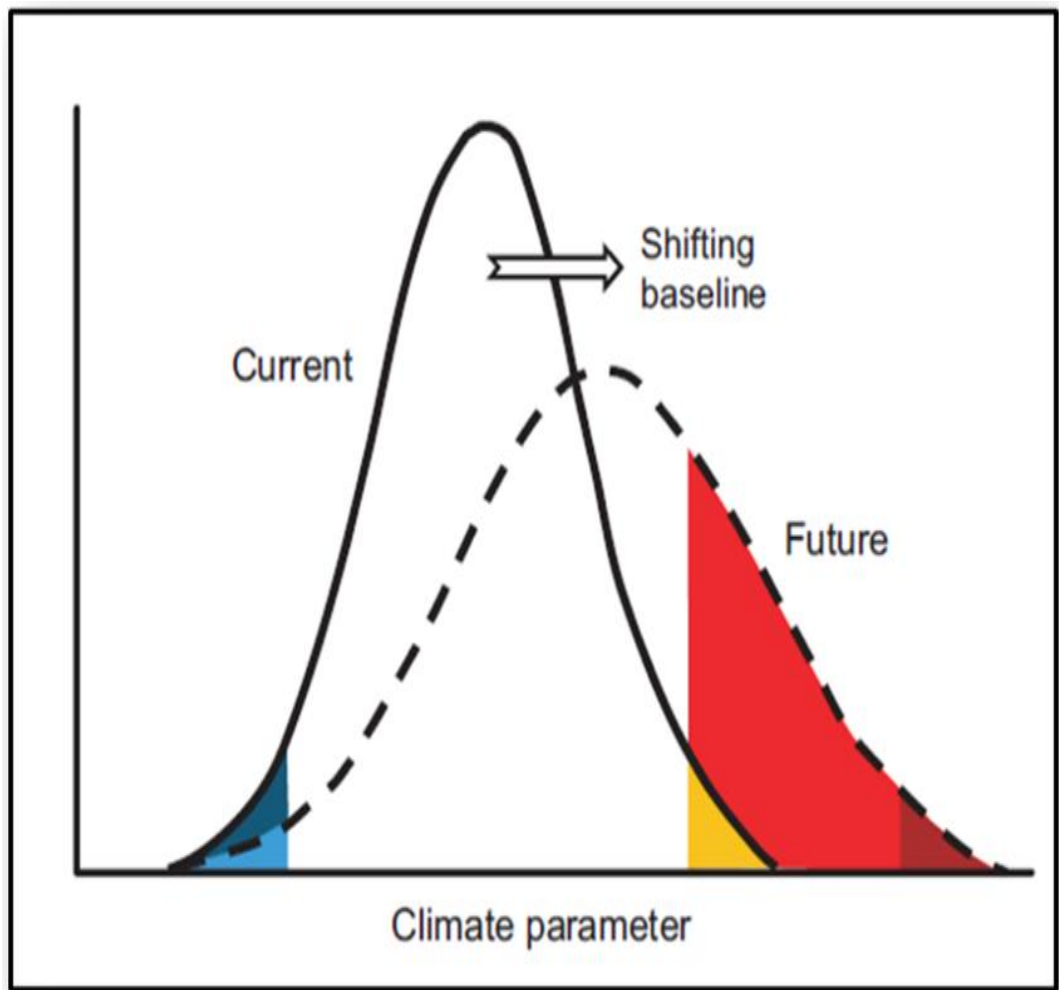


Figura 3.1. Rappresentazione di una possibile condizione futura in cui le condizioni atmosferiche sono variate. (Smith 2011)

1.2.2 Stato dell'arte

Numerosi studi correlativi forniscono l'evidenza che eventi climatici estremi possono avere un impatto ad ogni livello di organizzazione biologica, da un singolo individuo ad un ecosistema (Parmesan et al., 2000).

Ad esempio, l'estinzione di numerose popolazioni della farfalla *Euphydryas editha* sembra essere dovuta ad episodi estremi di alcune variabili ambientali. In California, tra il 1975 e il 1977, un periodo di siccità acuta ha postato all'estinzione di 5 popolazioni sulle 21 conosciute nella zona (Ehrlich et al. 1980; Singer and Ehrlich 1979). Periodi con precipitazioni invernali molto più intense delle medie stagionali hanno invece sortito effetti opposti in due sottospecie. In prossimità di San Francisco Bay si è verificato il collasso della popolazione di *E. editha bayensis* (Dobkin et al. 1987), mentre la popolazione di *E. editha quino* nel nord di Baja in Messico è cresciuta rapidamente (Murphy and White 1984).

Oltre a influire sulla mortalità dei singoli individui, gli eventi climatici estremi possono anche innescare cascate di eventi con effetti imprevedibili sulle popolazioni naturali. Nel 1992, intense piogge in zone generalmente semiaride nell'area sud occidentale degli Stati Uniti ha causato una produzione di biomassa vegetale molto superiore a quella ordinaria. Grazie a questa maggiore disponibilità di risorse alimentari, la popolazione del topo *Peromyscus maniculatus* crebbe, così da aumentare i contatti tra il genere umano e questi roditori che sono portatori dell'Hantavirus. Tutto ciò, nel 1993, ha portato ad un'epidemia di una sindrome cardiopolmonare provocata da Hantavirus che nell'uomo può essere letale. La stessa sequenza di eventi è stata riscontrata nel 1997 e nel 1999 (Hjelle and Glass 2000).

La rimozione di specie endemiche o l'introduzione di specie invasive sembra poter essere causata dal verificarsi di eventi climatici estremi. Ad esempio, un effetto

dell'uragano Omar del 2008 è stata la rimozione di un letto di fanerogame marine locali, specie in grado di trattenere un'elevata quantità di sedimento, e la successiva introduzione di fanerogame invasive appartenenti al genere *Halophyla* spp. (Steiner et al. 2010).

Gli effetti causati dagli eventi estremi possono essere drammatici e il recupero da parte degli ecosistemi può richiedere periodi molto lunghi o in alcuni casi non avvenire affatto. Questo è il caso di una popolazione la cui densità è scesa al di sotto di una soglia minima per cui il recupero non è più possibile (effetto Allee) o di un ecosistema che passa ad un altro stato alternativo stabile (Scheffer and Carpenter 2003, Folke et al. 2004).

Gli studi correlativi possono mettere in luce gli effetti deleteri causati dagli eventi estremi. Tuttavia, mancano di replicazione spaziale e temporale e per di più, non è possibile effettuare controlli o controlli artefatto per isolare correttamente gli effetti dovuti al trattamento rispetto ad altre possibili sorgenti di variabilità (Smith, 2011). Per ovviare a questi problemi, in periodi recenti, è aumentato il numero di esperimenti in cui si tenta di simulare eventi climatici estremi. Questi studi, se paragonati a quelli non manipolativi, hanno il grande vantaggio di poter controllare la natura dell'evento, permettendo di raggiungere una più esatta comprensione dei suoi effetti sulle dinamiche di popolazione e sugli ecosistemi.

Alcuni di questi studi, effettuati nella tundra sub-artica simulando estremi di temperatura su vegetazione e licheni, hanno evidenziato un declino nella copertura vegetale nei *plot* riscaldati e una riduzione nei tassi foto sintetici delle piante considerate (Marchand et al. 2006; Bjerke et al. 2011).

Tuttavia, la maggior parte di questi studi ha concentrato l'attenzione su un solo evento estremo, mentre pochi sono quelli che hanno testato gli effetti della concomitanza di eventi estremi, sia della stessa natura che diversi (ma vedi Van Peer et al. 2004 e Meisner et al. 2013). Nel contesto dei cambiamenti climatici globali, è probabile che le

popolazioni naturali subiscano l'effetto di più estremi ambientali e/o climatici, contemporaneamente o in periodi temporali ravvicinati (Smith 2011), i quali potrebbero generare impatti più severi e duraturi rispetto a quelli causati da un evento isolato. Infine, i pochi studi che hanno testa l'effetto di più estremi sono stati condotti in laboratorio o mesocosmi.

In conclusione, quello che emerge dalla letteratura è l'urgente necessità di colmare le lacune sugli effetti degli eventi estremi tramite esperimenti sul campo volti a testare gli effetti di episodi estremi, della stessa natura o diversi, isolati o ravvicinati nel tempo.

Nel presente lavoro di tesi è stato allestito un esperimento con lo scopo di testare l'effetto della concomitanza, o meno, di estremi di temperatura e precipitazioni sulle comunità microfitobentoniche dell'intertidale roccioso del Mediterraneo.

1.3. Sistema di Studio

In molti sistemi acquatici i microrganismi vivono all'interno di una matrice organica da essi prodotta (Potts 1999): tale sistema prende il nome di biofilm. Nell'intertidale roccioso, la componente autotrofa del biofilm, costituita principalmente da diatomee, cianobatteri e propaguli macroalgali (Hill and Hawkins 1991), prende il nome di microfitobenthos epilitico (dall'inglese *microphitobenthos*, MPB).

Il MPB è diffuso nelle aree costiere di tutto il globo in cui la luce, risorsa limitante per gli organismi che lo compongono, è in grado di raggiungere tali organismi. Il MPB è presente in una in diversi ambienti, quali le lagune, spiagge, paludi, zone intertidali e subtidali fangose, sabbiose o rocciose. Tali organismi, oltre ad occupare la superficie del substrato sono in grado di vivere anche all'interno di esso (MPB endolitico). Utilizzando una metafora letteraria ("The Secret Garden" di Frances Hodgson Burnett), tale comunità può essere considerata come un "Giardino Segreto", a sottolineare come le piccole dimensioni in realtà non rispecchino il ruolo fondamentale che il MPB ricopre in habitat

apparentemente privi di vegetazione (MacIntyre et al. 1996), come i livelli più alti dell'intertidale roccioso. In questi sistemi, infatti, il MPB epilitico contribuisce in modo significativo alla produttività primaria (Yallop et al. 1994); influenza l'insediamento di spore macroalgali e delle larve di alcuni invertebrati sessili (Keough & Raimondi 1995, 1996, Thompson et al. 1998, Wiczorek & Todd 1998); infine, rappresenta la principale risorsa di cibo per molti erbivori, specialmente molluschi microfagi come patelle e littorine (Underwood 1979, 1984a, Hawkins & Hartnoll 1983, Hawkins et al. 1992, Thompson et al. 2004).

Numerosi sono i fattori abiotici responsabili del controllo dell'abbondanza del MBP: la stagionalità, l'altezza sulla costa, l'esposizione al moto ondoso, i quali riflettono l'importanza delle fluttuazioni di temperature, luce e grado di umettamento nell'influenzare il MPB.

Generalmente, una maggiore abbondanza di questi microrganismi viene riscontrata nelle aree più in basso sulla costa rispetto a zone più elevate, sia nell'emisfero nord (Thompson et al. 2004) che nell'emisfero sud (Jackson et al. 2010). Inoltre, sempre in questi studi viene evidenziato il fatto che la biomassa si riduce nei periodi più caldi dell'anno. Questo pattern di distribuzione può essere spiegato come una risposta a numerosi fattori fisici, come ad esempio, una maggiore probabilità di essiccazione, un incremento della temperatura e dell'intensità luminosa con l'aumentare dell'altezza sulla costa. Nonostante questo, le variazioni stagionali non sono generalizzabili a scala globale. Nell'emisfero nord, infatti, si osserva una riduzione marcata della biomassa in fasce più elevate della costa nei periodi caldi (Thompson 2004) mentre nell'emisfero australe queste variazioni sembrano essere molto ridotte, sia in studi effettuati in Australia (Underwood 1984, Jackson 2011) che nel continente africano (Dye and White 1991).

Anche il moto ondoso sembra avere un ruolo nel determinare la biomassa dei

microrganismi presenti sulla costa. Nell'Europa nord occidentale si registra una presenza maggiore in aree più riparate (Jenkins e Hartnoll 2001), tuttavia la situazione si inverte quando sulla costa è presente una *canopy* di macroalghe (Thompson 2005, Jackson 2010).

Altri esempi di fattori abiotici che possono influire sulle modalità di distribuzione del EMPB possono essere la topografia del substrato e l'idrodinamismo. La presenza di crepe e fessure sulla roccia che riescono a trattenere una maggiore quantità di acqua creano, nello spazio circostante, le condizioni ambientali favorevoli per un maggiore sviluppo dei microrganismi (Jackson et al. 2013).

I fattori biotici, al pari dei fattori abiotici, svolgono un'azione significativa nel regolare la distribuzione spazio-temporale degli organismi degli ecosistemi di costa rocciosa. L'attività di erbivorismo, è uno dei principali fattori che regolano dell'abbondanza del MPB epilitico nella fascia alta di battigia (Mak & Williams 1999, Stanford & Davis 2005). Gli erbivori possono avere tuttavia anche effetti positivi indiretti sul MPB epilitico, aumentandone la biomassa. L'attività di erbivorismo può limitare la crescita di specie competitivamente dominanti, ma caratterizzate da una bassa produttività (Kaehler & Froneman 2002), o rimuovere lo strato superficiale, composto per lo più da cellule morte e detrito, facilitando così la penetrazione di luce e nutrienti (Hillebrand et al. 2000). Tali effetti positivi sono riscontrabili anche molti mesi dopo la loro rimozione (Skov et al. 2010). Gli erbivori possono avere effetti positivi diretti sul MPB, grazie all'escrezione di nutrienti (una risorsa limitante; Plangà & Branch 2000), o di muco, il quale facilita l'adesione e la crescita delle microalghe (Davies et al. 1992). Infine, l'attività di grazing, almeno per quanto riguarda le littorine, sembra essere mediata dalla piovosità e/o dall'altezza dell'onda (Dal Bello et al. 2015): questi organismi sono più attivi in condizioni umide e per questo sembra abbiano un impatto maggiore sul MPB durante giornate piovose e/o in condizioni di mare mosso (Bates and Hicks 2005).

1.4 Scopo del lavoro di tesi

Il presente lavoro di tesi si propone di testare l'ipotesi generale secondo cui la concomitanza temporale di estremi di temperatura giornalieri e di elevata deposizione di sedimento a seguito di intense precipitazioni generino effetti più marcati sulla biomassa del microfitobenthos epilitico, rispetto al manifestarsi degli stessi eventi in un periodo di tempo maggiore.

Per testare questa ipotesi, è stato allestito un esperimento sul campo che prevedeva la manipolazione delle due tipologie di evento (aumento di temperatura dell'aria e deposizione di sedimento), del grado di raggruppamento temporale (eventi vicini e lontani nel tempo) e dell'ordine con cui i due eventi si manifestavano (incremento di temperatura o deposizione di sedimento come primo evento seguito da un evento di natura uguale o diversa).

Gli estremi di temperatura sono stati ottenuti in maniera diretta riscaldando lo strato d'aria al di sopra del substrato roccioso tramite l'utilizzo di camere di alluminio equipaggiate con stufe a butano. Al contrario l'aumento di intensità nelle precipitazioni atmosferiche è stato simulato indirettamente, incrementando il carico sedimentario sulle unità sperimentali. La deposizione di sedimento sugli scogli, infatti, è legata principalmente all'erosione operata dalle precipitazioni atmosferiche (Wei et al. 2009). I cambiamenti previsti nell'intensità e nella frequenza di piogge intense, pertanto, è probabile che causino variazioni nei processi di erosione portando ad un incremento della quantità di detrito che raggiunge l'ambiente costiero.

Per quanto riguarda gli effetti principali di temperatura e sedimento, mi aspetto che gli estremi di temperatura abbiano un effetto negativo sulle microalghe a causa di un maggiore stress fisiologico così da determinare un declino della biomassa di EMPB. Fare previsioni sugli effetti della deposizione di sedimento è invece più difficile. L'aumento di

carico sedimentario potrebbe causare un incremento della biomassa di EMPB, favorito da un maggior apporto di nutrienti che si trovano naturalmente nel detrito. D'altro canto, lo strato di sedimento potrebbe impedire alla luce solare di raggiungere le microalghe, che ne sarebbero danneggiate a causa di una riduzione dell'attività fotosintetica, risultando in una diminuzione della biomassa del microfitobenthos. Tuttavia, poiché la sopravvivenza di questi microrganismi dipende strettamente dalla quantità di luce ambientale disponibile, mi aspetto effetti negativi sulla biomassa microalgale.

Per quanto riguarda gli effetti dell'ordine di incidenza e del grado di separazione temporale dei due estremi, mi aspetto che, nel caso venga riscontrata una chiara gerarchia negli effetti dovuti ad eventi diversi, l'ordine con cui essi si manifestano possa essere rilevante. Se, ad esempio, l'evento più impattante si manifesta per primo, mi aspetto una riduzione della biomassa più marcata (meno marcata) se il secondo evento è (non è) della stessa natura. Se invece, il primo evento a verificarsi è quello che causa gli effetti minori, qualunque sia la natura del secondo evento dovrebbe causare una drastica riduzione della biomassa del microfitobenthos. Inoltre, questi effetti possono essere ulteriormente complicati dal grado di raggruppamento temporale degli eventi, dato che, se essi avvengono in un intervallo sufficientemente ampio è possibile assistere ad un certo recupero da parte del popolamento microalgale.

Al contrario, se gli effetti dei due eventi sono comparabili, solamente il grado di raggruppamento temporale sarà importante e mi aspetto effetti più severi nella situazione in cui i due episodi si presentano in un intervallo temporale breve (Fig.1.1).

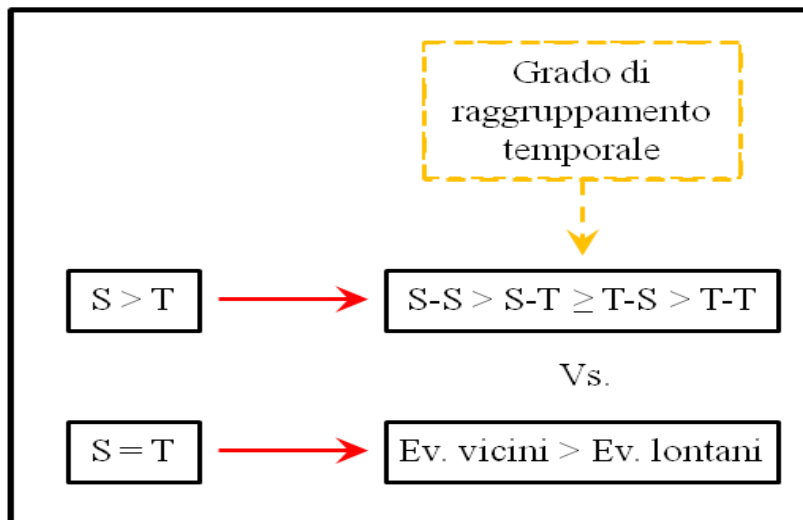


Figura1.1. Ipotesi sugli effetti dovuti al grado di raggruppamento temporale. Caso in cui è presente una gerarchia negli effetti e caso in cui gli effetti dei due trattamenti siano comparabili.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Sito di studio

L'esperimento è stato condotto lungo la costa di Calafuria (Livorno, 43°30' N, 10°19' E). Calafuria è costituita da piattaforme di arenaria che in corrispondenza dei livelli più alti della costa (0,3-0,5 m sopra il limite inferiore di bassa marea) sono caratterizzate da popolamenti di MPB, prevalentemente costituiti da cianobatteri. I principali erbivori che troviamo a queste altezze sulla costa sono le littorine della specie *Melaraphe neritoides* (L.) e alcuni gammaridei appartenenti all'ordine degli anfipodi. Si possono anche riscontrare esemplari di *Patella rustica*, che, pur vivendo a livelli più bassi della costa, possono compiere foraggiamenti occasionali in questa fascia. L'esperimento è stato ripetuto due volte: la prima nei mesi compresi tra Aprile e Settembre 2013, mentre la seconda tra settembre 2014 e febbraio 2015.

2.2 Disegno sperimentale

Il disegno sperimentale è costituito da 4 fattori: grado di separazione temporale (2 livelli: eventi lontani vs. ravvicinati), identità del primo evento (2 livelli: riscaldamento dell'aria vs. deposizione di sedimento), identità del secondo evento (2 livelli: uguale vs. diverso dal primo evento) e *plot* (3 livelli). Ciascun *plot* è costituito da un'area di substrato di 40x40 cm. Per le analisi sono state considerate 5 repliche che consistono in quadrati di 256x256 pixel scelti casualmente in ognuno dei *plot* trattati. I primi tre fattori sono fissi e incrociati tra loro, mentre il fattore *plot* è *random* e gerarchizzato in ciascuna combinazione degli altri tre. Sono stati aggiunti 3 controlli e 6 controlli artefatto per l'utilizzo di camere riscaldanti, per un totale di 33 *plot* (Fig. 2.1). I *plot* sono stati posizionati casualmente lungo la costa e sono stati marcati agli angoli con dei tasselli inseriti in appositi buchi, al fine di poterli rilocalizzare facilmente.

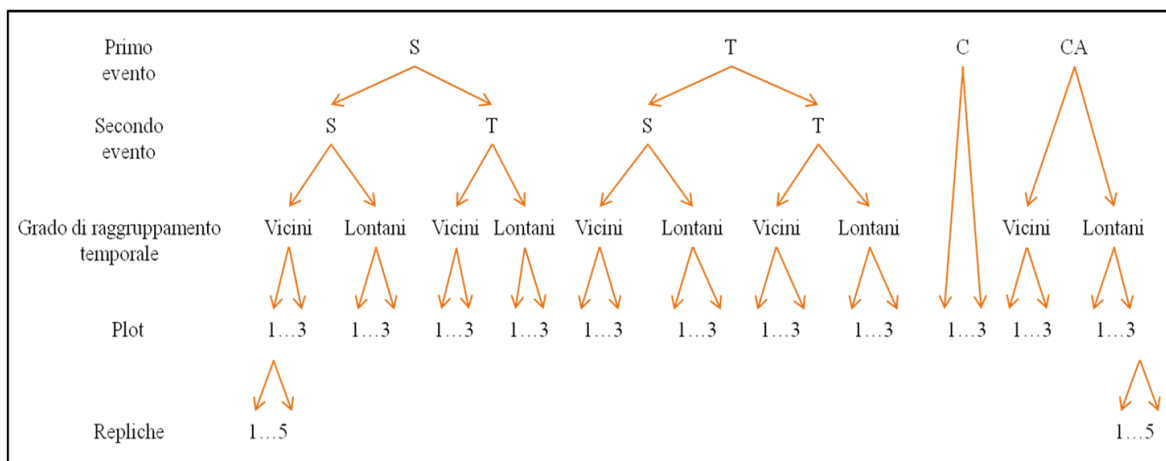


FIG. 2.1: Disegno sperimentale.

L'aumento della temperatura dell'aria (31°C per la prima ripetizione e 34°C per la seconda) è stato ottenuto grazie all'utilizzo di camere in alluminio equipaggiate con stufe a butano (camere riscaldanti). Le camere avevano le seguenti dimensioni: larghezza 0,4m x lunghezza 0,4m x altezza 0,4m. Un foro circolare presente su uno dei lati permetteva di assicurare la stufa alla camera e di mantenerla ad un'altezza di circa 10-15cm dal substrato, mentre una finestra, dotata di uno sportellino, sul lato opposto, consentiva ad un operatore di modulare la temperatura interna. La temperatura sperimentale è stata definita e ottenuta in maniera probabilistica: essa corrisponde a un valore di temperatura che presenta un *return time* di 100 anni, ovvero che si verifica una volta ogni 100 anni. Essa è stata calcolata fittando una distribuzione GEV (*Generalized Extreme Values*) alla serie temporale delle temperature massime giornaliere di Livorno (per i mesi compresi tra Aprile e Giugno e tra Settembre e Novembre dal 1951 al 2013, per la prima e la seconda ripetizione dell'esperimento, rispettivamente). Il trattamento di riscaldamento, pertanto, consisteva nel mantenere la temperatura dell'aria all'interno della camera in un intervallo di valori compresi tra 29°C e 31°C e tra 33°C e 35°C, per il primo e il secondo esperimento rispettivamente, per un periodo di due ore. Durante il trattamento la temperatura dell'aria e del substrato è stata costantemente monitorata attraverso l'utilizzo

di termometri digitali e registrata ad intervalli regolari di un minuto grazie a data *logger* digitali (Fig. 2.2).

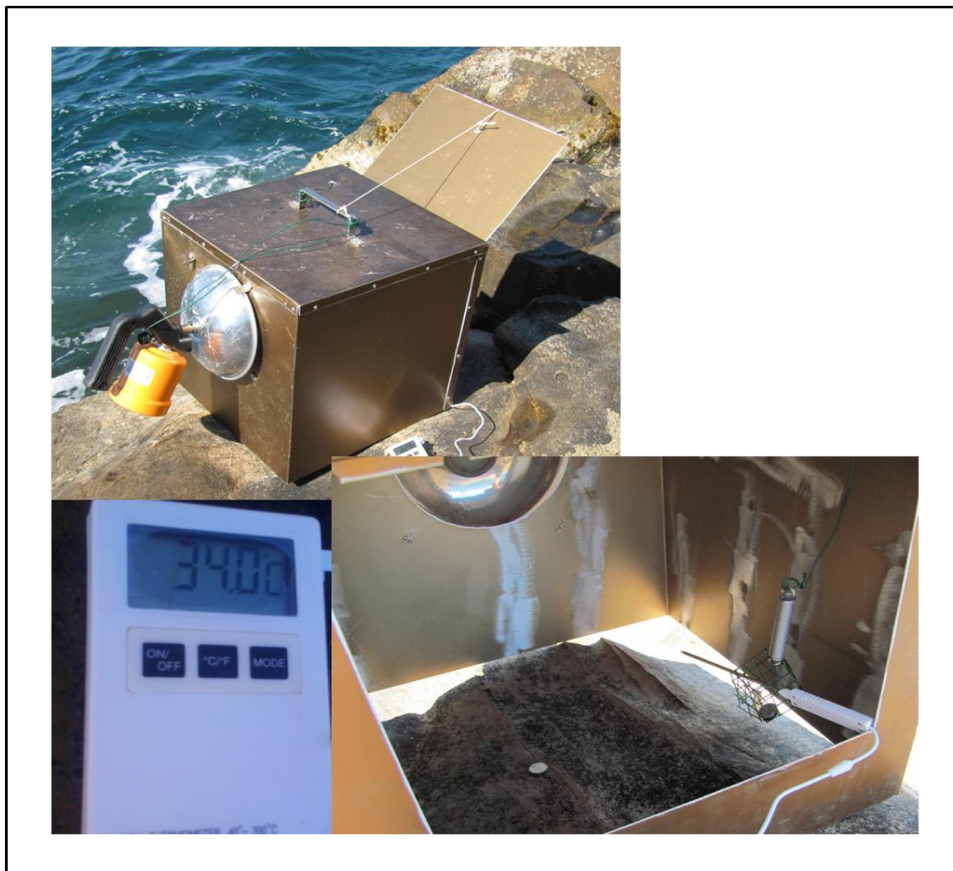


Figura 2.2. Camera riscaldante con stufa a butano, termometro digitale per monitorare la temperatura e collocazione dei *data logger* digitali all'interno della camera.

La costa di Calafuria, per la sua conformazione geologica, pendenza e ambiente circostante, è soggetta a episodi di *runoff* in seguito a precipitazioni intense, i quali causano il trasporto e la successiva deposizione di sedimento sul substrato roccioso. Tale sedimento è costituito generalmente da una componente terrigena, consistente in detrito di varia granulometria che proviene dalle aree boschive circostanti, e da limo, generato dall'erosione dell'arenaria (Airoldi 2003). Se agli eventi di deposizione causati dalla pioggia seguono periodi di alta pressione con condizioni di mare calmo, nelle aree di Calafuria in cui gli scogli sono più piatti sono visibili numerosi accumuli di sedimento con uno spessore che varia attorno ai 5mm. Il sedimento impiegato nei trattamenti è stato raccolto dagli accumuli

naturali presenti sulla costa, mescolato con acqua dolce e depositato sui *plot*, in modo tale da formare uno strato spesso circa 5mm (Fig. 2.3).



Figura 2.3. Deposito naturale di sedimento a seguito di intense precipitazioni e plot su cui è stato effettuato il trattamento.

Per quanto riguarda il grado di separazione temporale i due livelli del fattore, eventi ravvicinati e lontani nel tempo, sono stati ottenuti ripetendo i trattamenti due volte a distanza di circa due settimane e due mesi, rispettivamente.

2.3 Raccolta dati

Seguendo il metodo proposto da Murphy e co-autori (2006), ho utilizzato la concentrazione della clorofilla *a* come indicatore della biomassa del MPB. La quantità di clorofilla presente sul substrato è stata stimata come rapporto tra la riflettanza nella banda del NIR (infrarosso vicino), dove la clorofilla non assorbe, e quella nella banda del rosso, dove invece si registra il picco di assorbimento della clorofilla (Jordan 1969). Il rapporto NIR/red è definito *Ratio Vegetational Index*, RVI. In questo studio, per ottenere i valori di RVI e quindi le stime di clorofilla, ho utilizzato una macchina fotografica sensibile agli infrarossi (ADC ©). I valori di RVI ottenuti con l'ADC sono legati alla quantità di clorofilla presente sulla roccia da una relazione lineare (Dal Bello et al. 2015).

L'ADC è una macchina fotografica digitale progettata e ottimizzata per catturare la luce visibile a lunghezze d'onda maggiori di 520 nm e le lunghezze d'onda del NIR, fino a 920 nm. Questa macchina utilizza un filtro che permette di ottenere una foto composta da tre bande, una nel verde, una nel rosso e una nell'infrarosso. Queste possono essere considerate analoghe a quelle del blu, verde e rosso nelle normali fotocamere digitali. L'ADC produce immagini in formato RAW in scala di grigi, per cui, prima dell'utilizzo, queste foto sono state trasformate in formato TIFF mediante l'utilizzo del programma PixelWrench2 (Agricultural Camera User's 2010).

Le immagini avevano le dimensioni di 2560 x 1926 pixel e coprivano un'area di substrato di circa 52 x 34 cm. Quindi, la risoluzione spaziale di ogni pixel era approssimativamente di 0,2 mm.

Le foto sono state scattate fissando la macchina ad un treppiedi così da tenerla immobile per tutto il tempo necessario. Per far sì che tutte le foto catturassero sempre la stessa area di superficie, abbiamo utilizzato un distanziatore in legno lungo 60 cm, che permetteva di posizionare la fotocamera parallelamente al substrato roccioso. Diversi tempi di esposizione sono stati selezionati sulla base delle condizioni di illuminazione ambientale in modo tale da ottenere immagini luminose ma non sature.

Per poter calibrare il valore di ogni pixel nonostante le variazioni delle condizioni ambientali, in ogni foto, è stato incluso uno standard, costituito da una superficie lambertiana con riflettanza del 30%, valore adatto a rappresentare la luminosità della roccia di Calafuria quando sono presenti le microalghe. La calibrazione dei dati di riflettanza è stata ottenuta normalizzando i valori dei pixel di ogni banda per la luminosità dei pixel sullo standard, secondo la seguente formula:

$$\rho_{\lambda image} = \frac{DN_{\lambda image} \delta_{\lambda panel}}{DN_{\lambda panel}}$$

dove:

$\rho_{\lambda} image$ = Riflettanza di ogni pixel nella banda λ .

$DN_{\lambda} image$ = Numero Digitale di ogni pixel dell'immagine nella banda λ .

$\delta_{\lambda} panel$ = Fattore di riflettanza dello standard per la banda λ .

$DN_{\lambda} panel$ = Numero Digitale di ogni pixel dello standard nella banda λ .

Successivamente, le fotografie ottenute sono state processate con il programma ImageJ. Sono stati scelti in modo casuale 5 quadrati di 256x256 pixel. Per ognuno di essi è stata stimata la concentrazione di clorofilla *a* presente in ogni pixel e successivamente ne è stata ricavata la concentrazione media per ogni quadrato. Queste stime della concentrazione di clorofilla sono utilizzate come indicatori della quantità di biomassa presente nel *plot* considerato.

Durante lo studio, i *plot* trattati separatamente nel tempo sono stati campionati tre volte tra un trattamento e l'altro, mentre, per quelli i cui trattamenti erano ravvicinati nel tempo non sono stati effettuati campionamenti intermedi. Tutti i *plot* sono stati campionati almeno tre volte dopo entrambi i trattamenti.

Durante la seconda ripetizione dell'esperimento sono state riscontrate elevate densità di molluschi gasteropodi della specie *Melaraphe neritoides* (L.), tanto da rendere necessaria la rimozione di questi erbivori prima del campionamento con l'ADC. Tuttavia, al fine di quantificare l'eventuale effetto della presenza degli erbivori sulla biomassa del MPB, ciascun *plot* è stato fotografato in formato macro con una macchina digitale. Una volta in laboratorio, le immagini sono state visualizzate sullo schermo di un computer e, sovrapponendo loro una griglia costituita da 100 sub-quadrati, adattata all'area del *plot* fotografato, è stato contato il numero degli erbivori presenti.

2.4 Analisi

Al fine di valutare gli effetti dovuti al grado di raggruppamento temporale, alla natura del primo e del secondo evento e alle loro interazioni sulla biomassa del MPB, ho utilizzato i *Mixed Effect Model* tramite le funzioni *lme* e *lmer* all'interno dei pacchetti *nlme* e *lme4* del programma R 3.1.0 (R software project. <http://www.r-project.org/>).

I *Mixed Effect Models* permettono di distinguere tra effetti fissi, che influenzano la media della variabile di risposta, e *random*, che influenzano, invece, la varianza associata ad essa (Pinheiro and Bates 2000).

I *Mixed Effect Models* sono da usare, per esempio, quando il disegno di campionamento include effetti di fattori fissi, ma si ha una qualche forma di non-indipendenza (dovuta ad esempio ad autocorrelazione tra misure ripetute nel tempo negli stessi *plot*, come nel presente studio). La non-indipendenza tra osservazioni rappresenta un problema per l'ecologo, in quanto una delle più importanti assunzioni dell'analisi statistica standard è l'indipendenza degli errori. Riprendendo l'esempio di cui sopra, misure ripetute nel tempo sugli stessi *plot* non hanno errori indipendenti poiché le peculiarità di un dato *plot* si riflettono in tutte le misure fatte su di esso.

Le analisi hanno previsto inizialmente l'utilizzo del modello fittato col metodo del *restricted maximum likelihood (REML)*, per valutare la conformità delle assunzioni parametriche (Singer and Willet 2003). Successivamente, il modello è stato fittato nuovamente utilizzando il metodo del *maximum likelihood (ML)* al fine di stimare gli effetti fissi (o parametrici). Il tempo è stato incluso tra gli effetti fissi del modello per valutare gli effetti dei trattamenti durante il periodo di recupero del biofilm.

Per tenere in considerazione le differenze nel tempo trascorso tra i campionamenti dei *plot* trattati separatamente nel tempo e quelli trattati in modo aggregato, il tempo è stato

codificato in modo da riflettere la distanza media, in giorni, tra le date di campionamento e le date di applicazione dei trattamenti (“*elapsed time*”).

Le tre date di campionamento intermedie (cioè quelle effettuate tra le due applicazioni dei trattamenti separati nel tempo) sono state escluse dalle analisi principali. Questi dati, tuttavia, sono stati utilizzati per valutare se al momento del secondo trattamento i popolamenti di biofilm si trovavano ancora in uno stato perturbato o se avevano mostrato un recupero.

Un’ulteriore analisi è stata svolta, mediante l’utilizzo di contrasti *a priori*, per confrontare i controlli sia con i *plot* trattati che con i controlli artefatto. In questo modo è stato possibile valutare l’effetto dei trattamenti ed escludere un possibile artefatto dovuto alle camere riscaldanti, come, ad esempio, l’effetto dell’ombreggiamento.

Le analisi sono state svolte in modo analogo sia per la prima che per la seconda ripetizione dell’esperimento. Nella seconda ripetizione, tuttavia, un’ulteriore indagine è stata effettuata allo scopo di valutare gli effetti della presenza consistente di esemplari dell’erbivoro *Melaraphe neritoides* (L.).

3. RISULTATI

3.1 Biomassa del MPB

Dal grafico che mostra l'andamento dei valori medi di clorofilla per i *plot* separatamente per trattamento nel corso della prima ripetizione dell'esperimento si evince che i trattamenti effettuati hanno causato una riduzione della biomassa di MPB nei *plot* trattati rispetto a quella dei controlli (Fig 3.1).

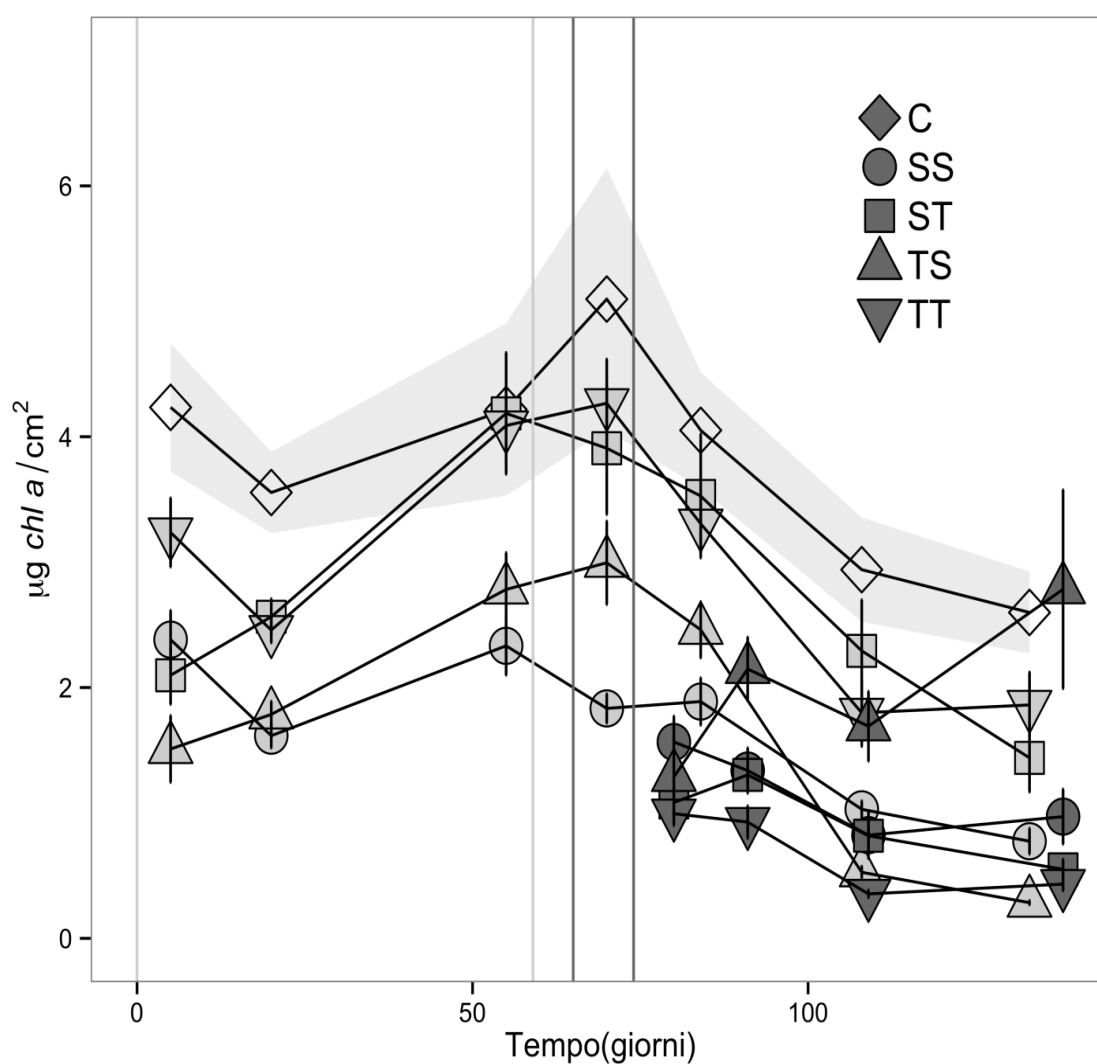


Figura 3.1: Andamento temporale della concentrazione media di clorofilla *a* nei *plot* trattati e di controllo ($n=3 \pm$ errore standard). Bianco: controlli; grigio chiaro: eventi lontani; grigio scuro: eventi vicini. Le linee nei colori corrispondenti ai trattamenti corrispondono alle date in cui essi sono stati applicati. Prima ripetizione dell'esperimento.

Nella seconda ripetizione dell'esperimento è stato rilevato un decremento generale della biomassa del MPB per tutti i *plot*, tanto che, dopo l'applicazione di tutti i trattamenti, non sembrano esserci differenze tra unità sperimentali di controllo e trattate (Fig. 3.2).

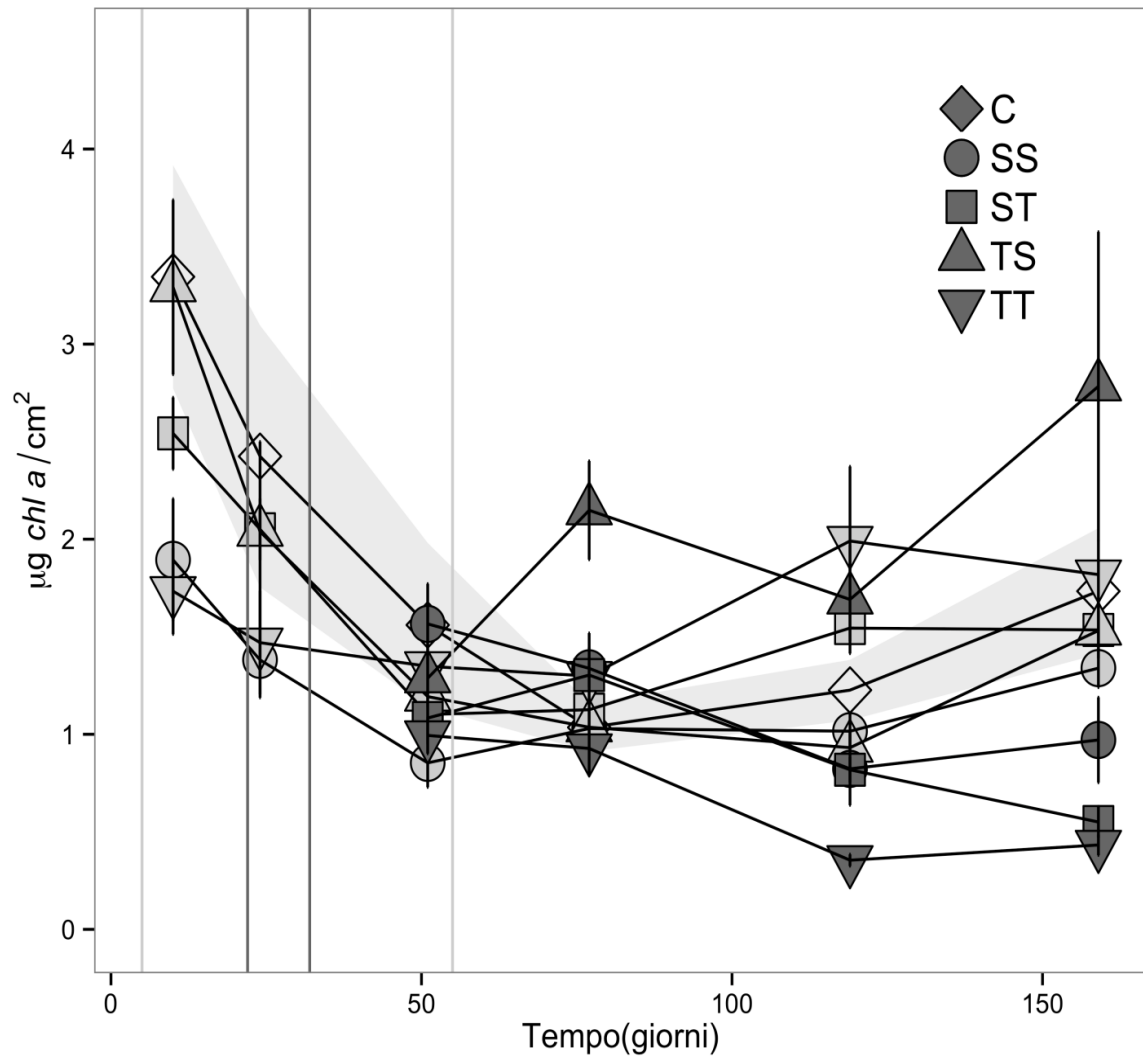


Figura 3.2: Andamento generale nel tempo della concentrazione media di clorofilla *a* nei *plot* trattati e di controllo ($n=3 \pm$ errore standard). Bianco: controlli; grigio chiaro: eventi lontani; grigio scuro: eventi vicini. Le linee nei colori corrispondenti ai trattamenti corrispondono alle date in cui essi sono stati applicati. Seconda ripetizione dell'esperimento.

Per prima cosa, è stata condotta un'analisi tramite *mixed effect model*, separatamente per ciascuna ripetizione dell'esperimento, sulle date di campionamento effettuate nel periodo compreso tra i due eventi applicati separatamente nel tempo.

Da tali analisi, si evince che i primi trattamenti di riscaldamento della temperatura dell'aria e di deposizione di sedimento causano, in entrambe le ripetizioni dell'esperimento, una significativa riduzione della biomassa del MPB (Tab. 3.1 e 3.2). Dopo il 50esimo giorno dai trattamenti, la biomassa dei controlli e dei *plot* trattati è di nuovo comparabile. Tuttavia, mentre nel primo caso si assiste ad un completo recupero, nella seconda ripetizione dell'esperimento la biomassa subisce un calo indipendentemente dal tipo di disturbo a cui sono stati sottoposti i *plot* (Fig. 3.3 e 3.4).

Tabella 3.1: *Mixed effect model* per le medie di clorofilla *a* per le prime tre date di campionamento e seguito del primo evento di disturbo. Prima ripetizione dell'esperimento.

*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$.

Effetti Fissi		MPDC		Termine lineare del tempo	
		<i>Coefficienti (SE)</i>		<i>Coefficienti (SE)</i>	
Intercetta (Controlli)	γ_{00}	3.080 (0.31)	***	γ_{10}	0.003 (0.010)
Sedimento	γ_{01}	-1.021 (0.434)	*	γ_{11}	0.016 (0.014)
Riscaldamento	γ_{02}	-0.988 (0.434)	*	γ_{12}	0.019 (0.014)
Effetti Random		Varianze		Correlazione	
MFSD	σ^2_{01}	0.511	MPDC, Termine lineare del tempo	-0.463	
Termine lineare del tempo	σ^2_{10}	0.001			
Residui	σ^2_e	0.384			

MPDC: Media alla prima data di campionamento.

Tabella 3.2: *Mixed effect model* per le medie di clorofilla *a* per le prime tre date di campionamento e seguito del primo evento di disturbo. Seconda ripetizione dell'esperimento.

*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$.

Effetti Fissi		MPDC		Termine lineare del tempo	
		<i>Coefficiente (ES)</i>		<i>Coefficiente (ES)</i>	
Intercetta (Controlli)	γ_{00}	3.352 (0,322)	***	γ_{10}	-0.040 (0,004)
Sedimento	γ_{01}	-1.171(0,456)	*	γ_{11}	0.011 (0.006)
Riscaldamento	γ_{02}	-1.169 (0,456)	*	γ_{12}	0.017 (0.006)
Effetti Random		<i>Varianze</i>			
MPDC	σ^2_{01}	0.558			
Residuo	σ^2_e	0.447			

MPDC: Media alla prima data di campionamento.

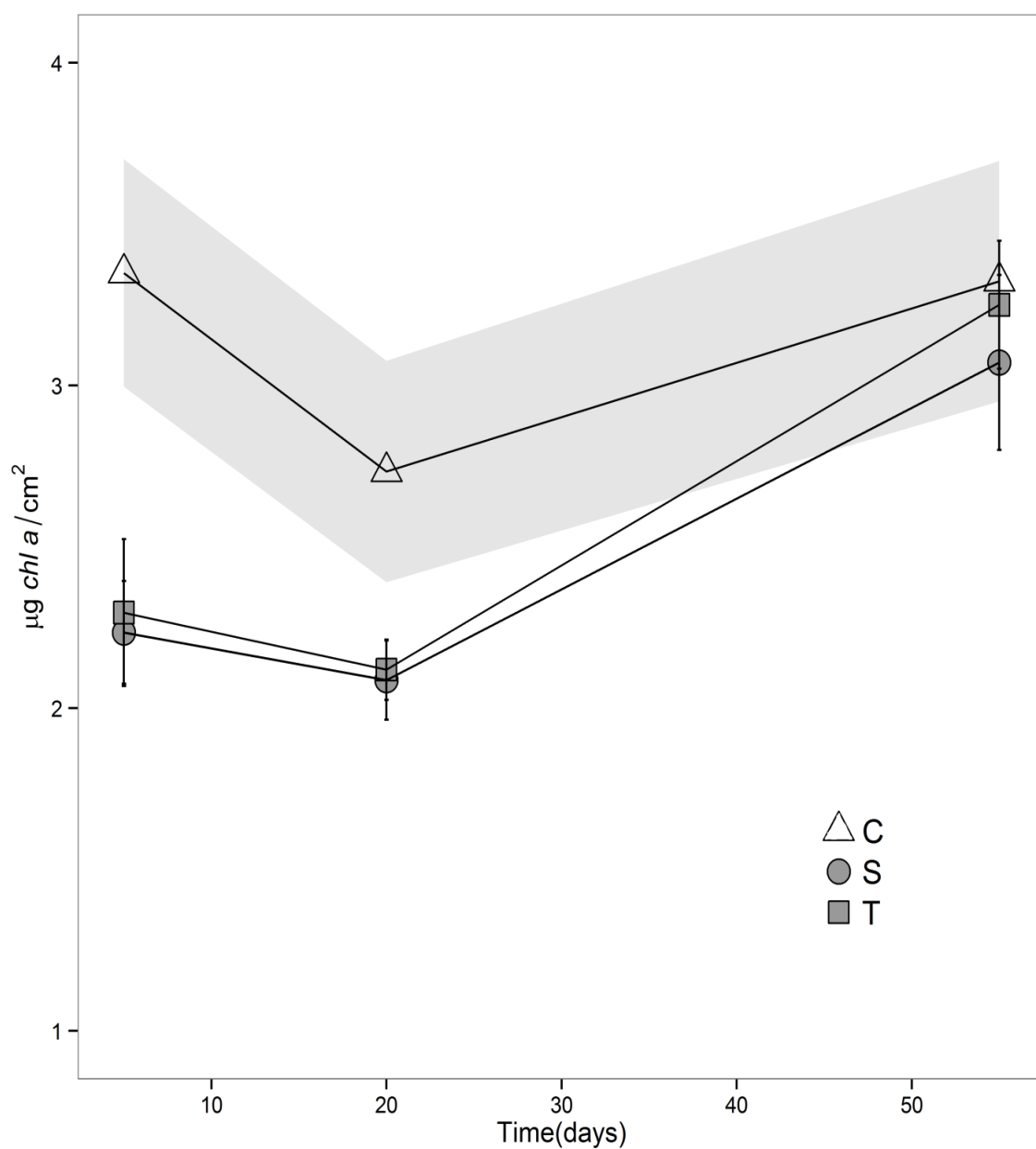


Figura 3.3: Andamento nel tempo della concentrazione media di clorofilla *a* nei *plot* trattati e di controllo dopo la prima applicazione dei trattamenti lontani nel tempo (n=6, media \pm errore standard). Prima ripetizione dell' esperimento.

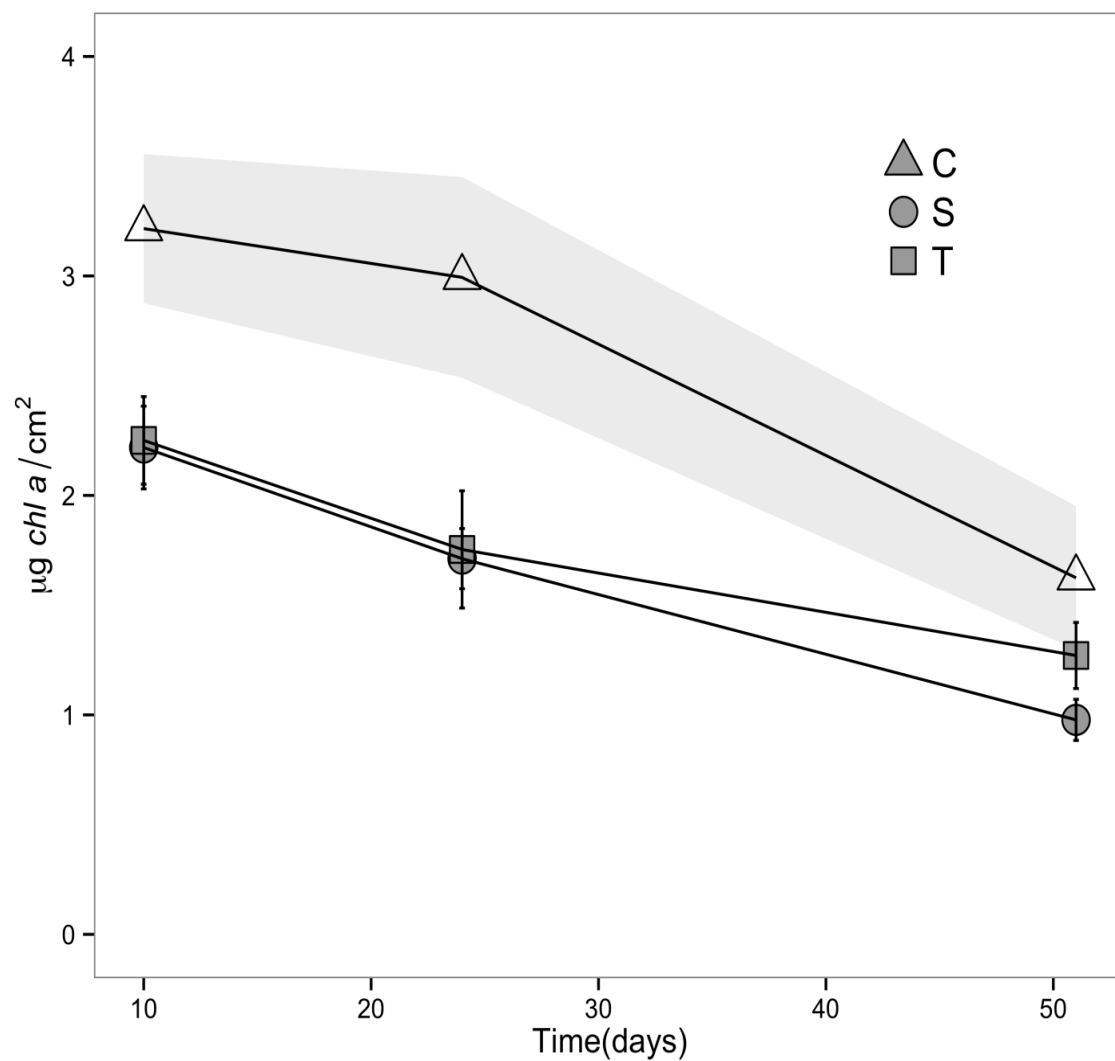


Figura 3.4: Andamento nel tempo della concentrazione media di clorofilla *a* nei *plot* trattati e di controllo dopo la prima applicazione dei trattamenti lontani nel tempo ($n=6$, media \pm errore standard). Seconda ripetizione dell'esperimento.

Successivamente, le analisi hanno previsto l'utilizzo dei *mixed effect model* per testare gli effetti dei trattamenti e delle loro interazioni sulla biomassa del MPB nelle date di campionamento successive all'applicazione di entrambi i trattamenti, sia per gli eventi lontani che per quelli vicini nel tempo.

I risultati del primo esperimento mostrano che, al giorno 42, i *plot* trattati separatamente nel tempo risultano meno impattati rispetto a quelli trattati in modo ravvicinato (effetto del “grado di raggruppamento temporale degli eventi” statisticamente significativo, $p < 0.001$, Tab. 3.3). I risultati evidenziano inoltre traiettorie temporali differenti in relazione a tutti i fattori presi in esame (interazione 1° evento x 2° evento x grado di raggruppamento temporale nel tempo statisticamente significativa, $p < 0.05$, Tab. 3.3), nonostante si possa ravvisare un declino più netto della biomassa del MPB nei *plot* trattati separatamente nel tempo rispetto a quelli trattati in maniera ravvicinata (Fig. 3.5).

Tabella 3.3 ANOVA basata sul *mixed effect model* sulla media di clorofilla *a* per tutte le date di campionamento della prima ripetizione dell'esperimento.

*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$.

Sorgente di Variabilità	g.d.l.	Valore di F	
Natura 1° ev.	16	0.53348	
Natura 2° ev.	16	3.13097	
Raggrupp.	16	52.08624	***
Tempo	64	37.65984	***
1° ev. x 2° ev.	16	1.21829	
1° ev. x Raggrupp.	16	2.07403	
2° ev. x Raggrupp.	16	4.34732	
1° ev. x tempo	64	0.06070	
2° ev. x tempo	64	3.35930	
Raggrupp. x tempo	64	26.97910	***
1° ev. x 2° ev. x Raggrupp.	16	1.47798	
1° ev. x 2° ev. x tempo	64	0.01117	
1° ev. x Raggrupp. x tempo	64	5.18287	
2° ev. x Raggrupp. x tempo	64	0.54096	
1° ev. x 2° ev. x Raggrupp. x tempo	64	5.41163	*

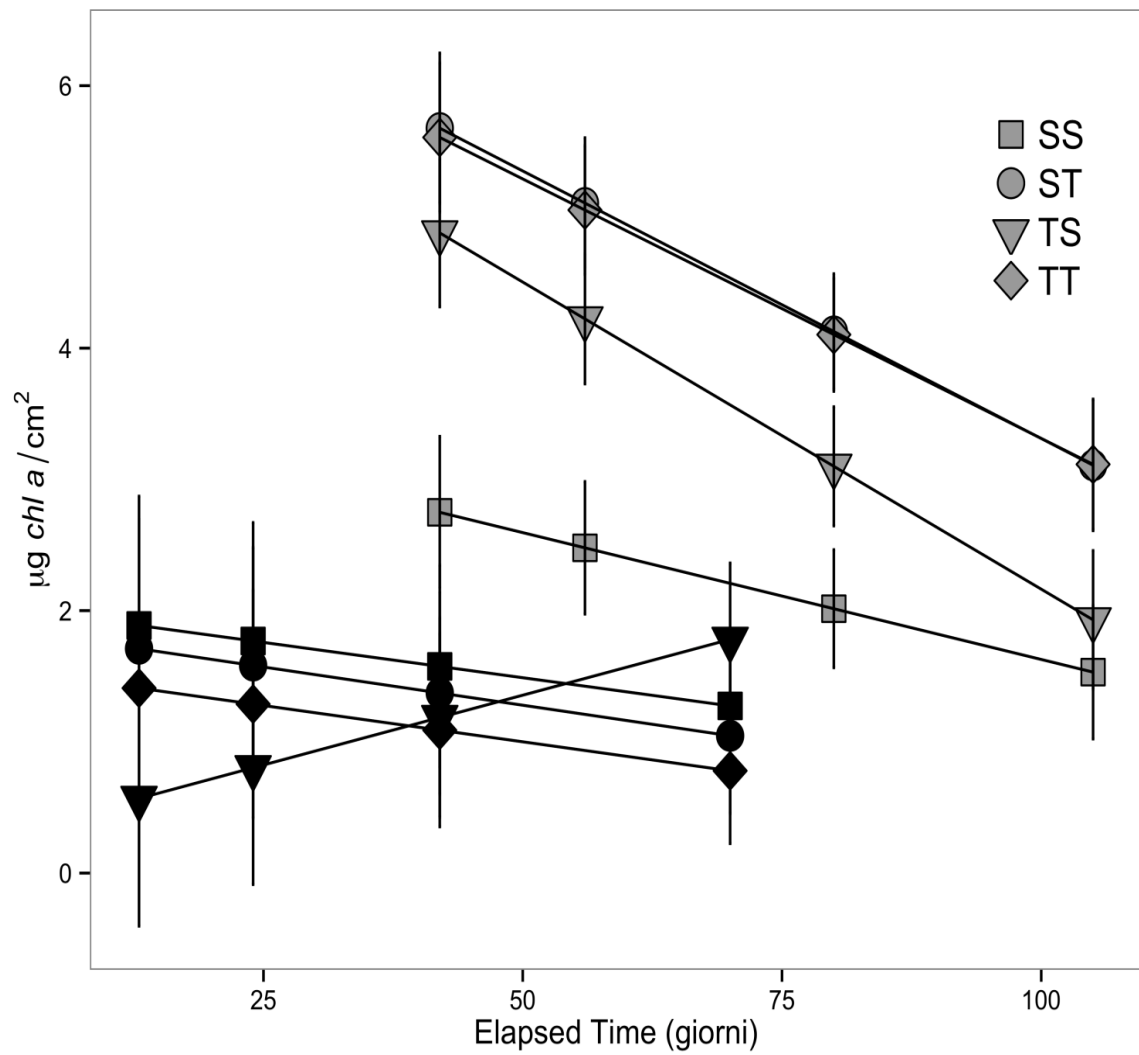


Figura 3.5. Andamento nel tempo della concentrazione media di clorofilla *a* nei *plot* trattati per tutte le date di campionamento della prima ripetizione dell'esperimento ottenuta dai parametri del modello (n=3, media \pm errore standard). Grigio: eventi separati. Nero: eventi vicini.

I risultati relativi alla seconda ripetizione dell'esperimento mostrano che, contrariamente a quanto avvenuto nella prima ripetizione, i *plot* trattati separatamente nel tempo risultano più impattati rispetto a quelli trattati in modo ravvicinato in maniera statisticamente significativa (effetto del “grado di raggruppamento temporale degli eventi” statisticamente significativo, Tab. 3.4, $p < 0.001$). Non si evincono, invece, effetti statisticamente significativi dei trattamenti e delle loro interazioni sulle traiettorie nel tempo della clorofilla (Tab. 3.4 e Fig. 3.5).

Tabella 3.4 ANOVA basata sul *mixed effect model* sulla media di clorofilla *a* per tutte le date di campionamento della seconda ripetizione dell'esperimento.

***, $p < 0.001$.

Sorgente di Variabilità	g.d.l.	Valore di F	
Natura 1° ev.	16	0.03738	
Natura 2° ev.	16	1.54889	
Raggrupp.	16	17.45820	***
Tempo	52	3.90716	
1° ev. x 2° ev.	16	0.20287	
1° ev. x Raggrupp.	16	0.46489	
2° ev. x Raggrupp.	16	0.44185	
1° ev. x tempo	52	0.02101	
2° ev. x tempo	52	0.00080	
Raggrupp. x tempo	52	1.42769	
1° ev. x 2° ev. x Raggrupp.	16	0.10116	
1° ev. x 2° ev. x tempo	52	0.31675	
1° ev. x Raggrupp. x tempo	52	0.47507	
2° ev. x Raggrupp. x tempo	52	0.05405	
1° ev. x 2° ev. x Raggrupp. x tempo	52	0.19222	

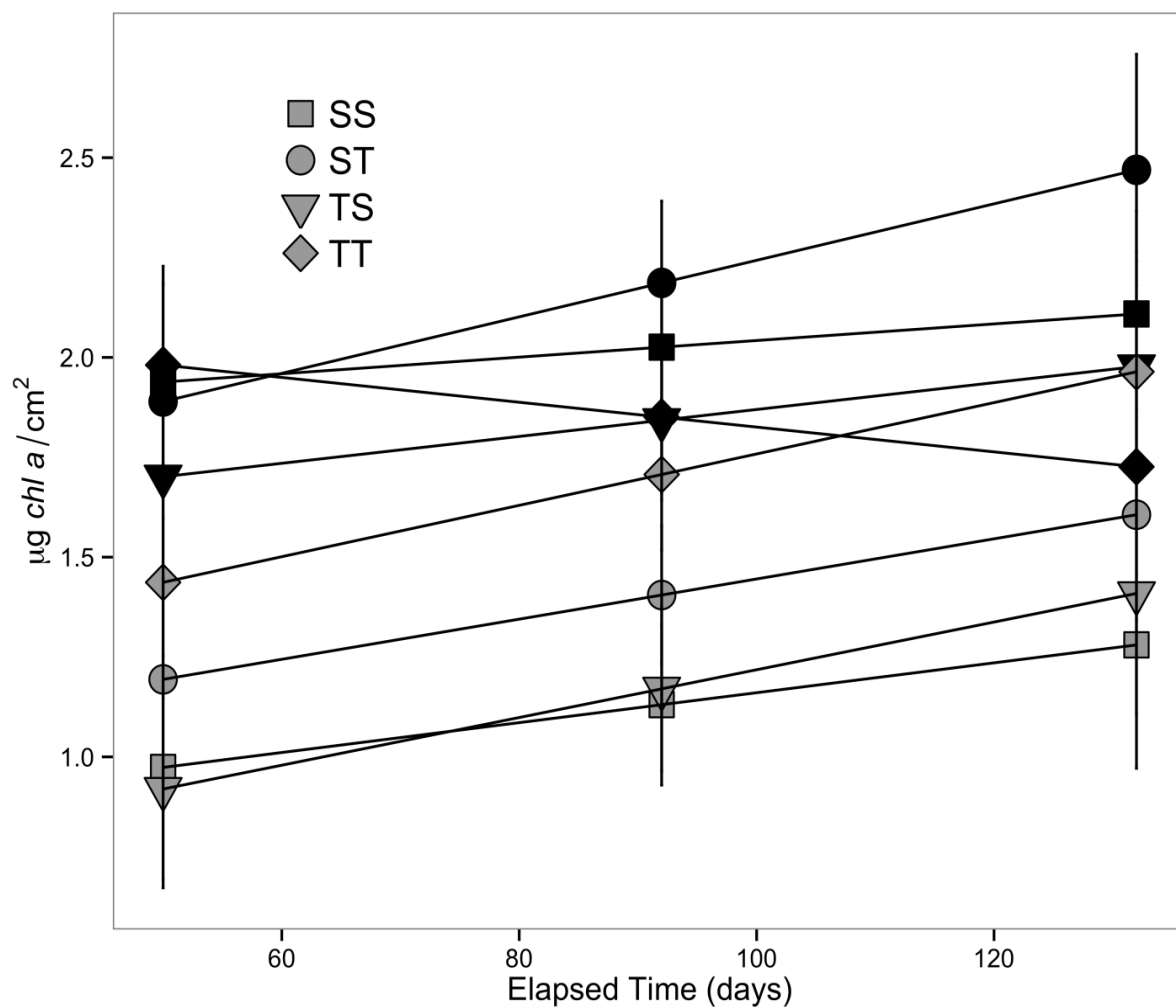


Figura 3.6. Andamento nel tempo della concentrazione media di clorofilla *a* nei *plot* trattati per tutte le date di campionamento della seconda ripetizione dell'esperimento ottenuta dai parametri del modello ($n=3$, media \pm errore standard). Grigio: eventi separati. Nero: eventi vicini.

Per quanto riguarda la prima ripetizione dell'esperimento, l'analisi tramite contrasti *a priori* ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra unità sperimentali di controllo e trattate, mentre non è stata riscontrato nessun artefatto dovuto all'uso delle camere riscaldanti, dal momento che controlli e controlli artefatto non sono risultati statisticamente differenti (Tab. 3.5). Nella seconda ripetizione, al contrario, il valore medio

di clorofilla in controlli e controlli artefatto (statisticamente non differenti) è risultato comparabile a quello riscontrato nei trattamenti (Tab. 3.6).

Tabella 3.5 Mixed effect model sui valori medi di clorofilla *a* per le date della prima ripetizione dell'esperimento con contrasti *a priori* al fine di valutare le differenze tra controlli (C) vs. controlli artefatto (CA) e controlli vs. unità sperimentali trattate (altri).

***, $p < 0.001$.

Effetti Fissi		M42G		Termine lineare del tempo		
		<i>Coefficiente (ES)</i>			<i>Coefficiente (ES)</i>	
Intercetta	γ_{00}	2.53 (0.178)	***	γ_{10}	-0.018 (0.002)	***
C vs. CA	γ_{01}	-0.57 (0.527)		γ_{11}	-0.033 (0.005)	***
C vs. Altri	γ_{02}	-0.354 (0.089)	***	γ_{12}	-0.002 (0.001)	
Effetti Random		<i>Varianza</i>				
M42G	σ^2_{01}	0.86				
Residuo	σ^2_e	0.823				

M42G: Media al 42esimo giorno

Tabella 3.5 Mixed effect model sui valori medi di clorofilla a per le date della seconda ripetizione dell'esperimento con contrasti *a priori* al fine di valutare le differenze tra controlli (C) vs. controlli artefatto (CA) e controlli vs. unità sperimentali trattate (altri).

*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$.

Effetti Fissi		M50G		Termine lineare del tempo	
		<i>Coefficiente (ES)</i>		<i>Coefficiente (ES)</i>	
Intercetta	γ_{00}	1.53 (0.084)	***	γ_{10}	-0.004 (0.001) ***
C vs. CA	γ_{01}	-0.14 (0.244)		γ_{11}	-0.004 (0.002)
C vs. Altri	γ_{02}	0.01 (0.041)		γ_{12}	-0.002 (0.001)
Effetti Random		<i>Varianza</i>			
M50G	σ^2_{01}	0.166			
Residuo	σ^2_e	0.402			

M50G: Media al 50esimo giorno

3.2 Abbondanza degli erbivori.

Il numero medio degli erbivori appartenenti alla specie *Melaraphe neritoides* (L.) presenti sulle unità sperimentali durante la prima ripetizione dell'esperimento è uguale a 1,78.

Nella seconda ripetizione il numero medio di littorine è cresciuto nel tempo (Fig. 3.7). Tra le unità trattate separatamente nel tempo e le altre si registra una differenza nel numero medio di littorine: nelle prime la media è di 149,33 mentre, nelle altre è di 97.89 littorine; il numero medio di littorine nei plot di controllo è di 122,75 (Fig. 3.8).

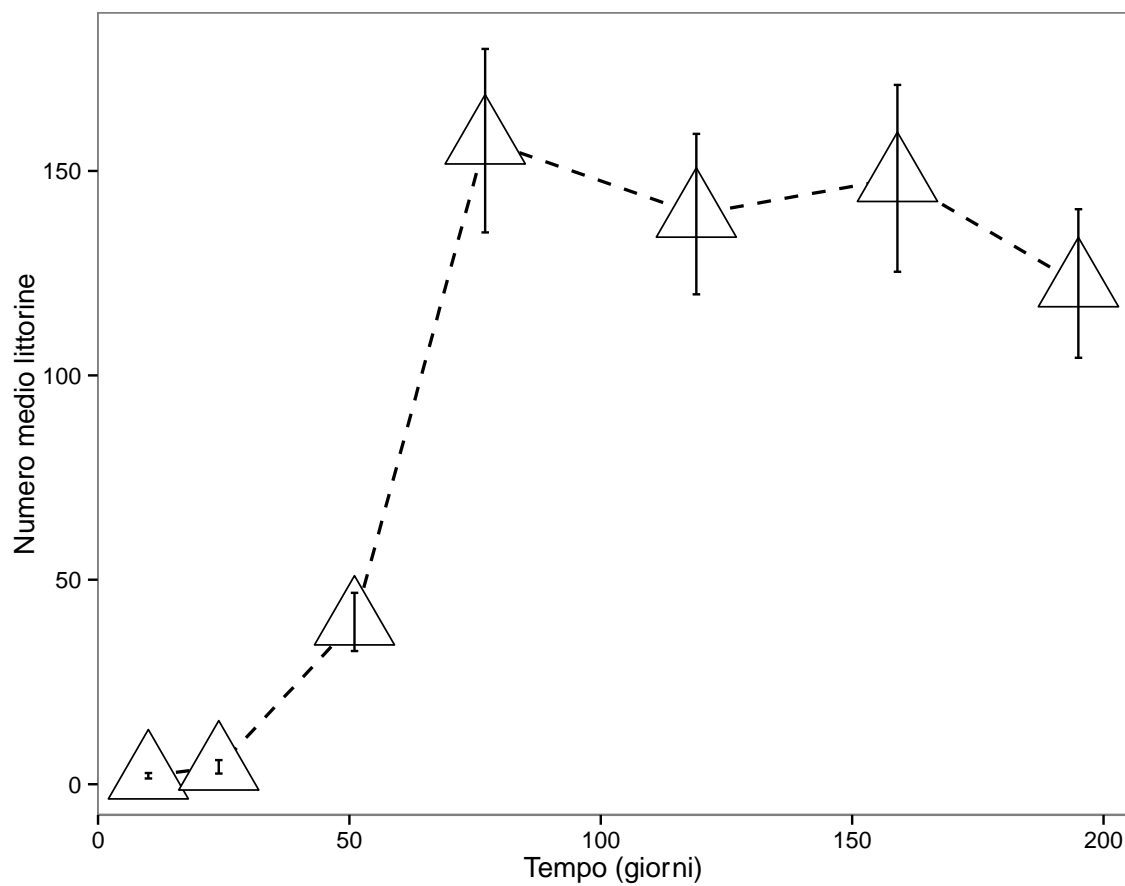


Figura 3.7. Numero medio di individui di *Melaraphe neritoides* (L.) separatamente per ciascuna data di campionamento (n=33, media \pm errore standard). Seconda ripetizione dell'esperimento.

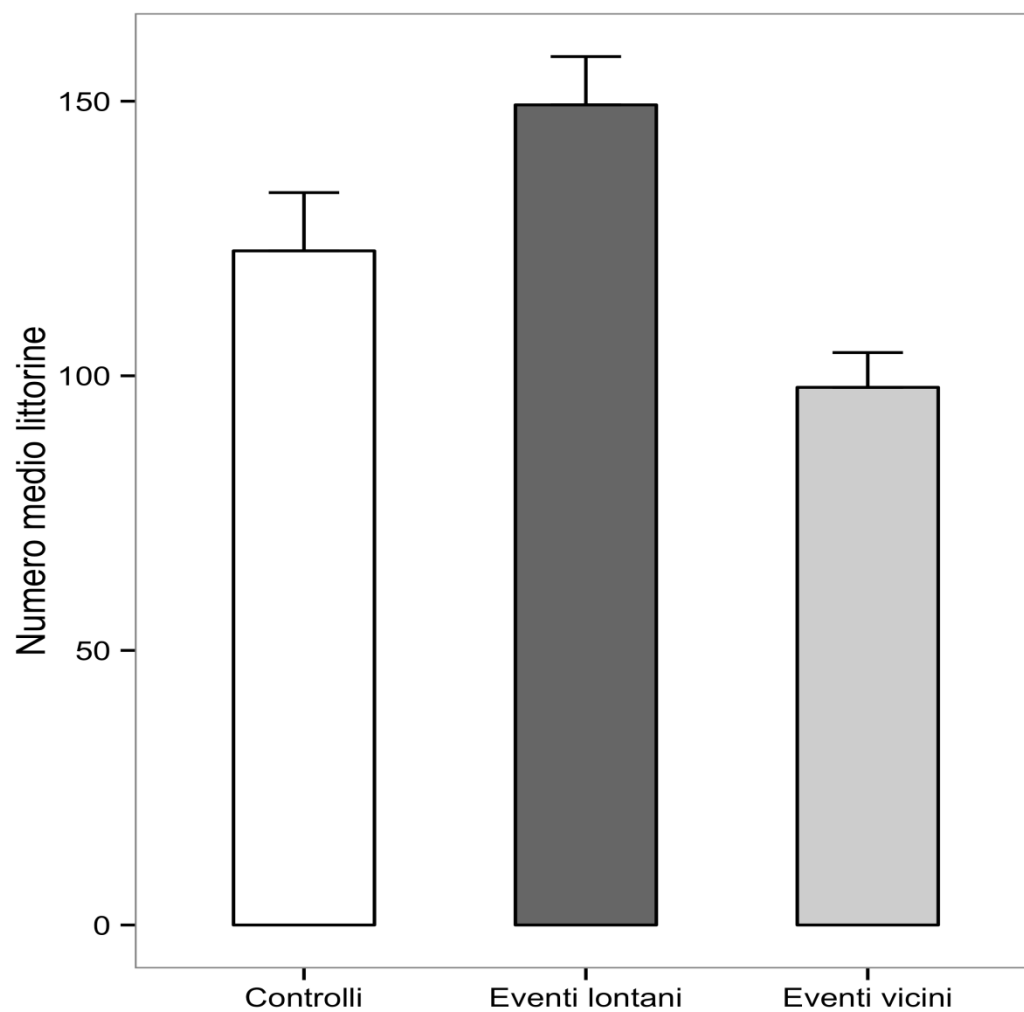


Figura 3.8. Numero medio di individui di *Melaraphe neritoides* (L.) per tutte le date di campionamento separatamente per gli eventi lontani e vicini nel tempo ($n=72$, media \pm errore standard) e per i *plot* di controllo ($n=12$, media \pm errore standard). Seconda ripetizione dell'esperimento.

4 DISCUSSIONE

I risultati del presente lavoro di tesi evidenziano l'importanza del grado di aggregazione temporale sulla risposta del MPB all'incidenza di eventi estremi di temperatura e deposizione di sedimento. In particolare, l'ipotesi secondo cui la concomitanza di eventi estremi produce gli effetti maggiori sulla biomassa del microfitobenthos è supportata quando il popolamento microfitobentonico recupera nel tempo intercorso tra due eventi distanti nel tempo. Al contrario, quando il recupero è rallentato, in questo caso dall'attività di pascolo delle littorine, sono gli eventi distanti ad avere gli impatti maggiori sul biofilm.

Una prima analisi è stata effettuata sui dati ottenuti dal campionamento dei *plot* trattati separatamente nel tempo dopo il primo evento estremo di disturbo. I risultati, sia per la prima che per la seconda ripetizione dell'esperimento, evidenziano come un estremo di temperatura determini effetti comparabili a quelli di un evento estremo di deposizione di sedimento, in termini di riduzione della biomassa del MPB. La riduzione di biomassa osservata può essere dovuta ai diversi fattori di stress a cui le microalghe sono state sottoposte. Il sedimento, impedendo la penetrazione della luce e creando condizioni di anossia, potrebbe aver impedito l'attività fotosintetica e, come conseguenza, aver determinato una riduzione della biomassa del MPB (Stal 1995). La crescita di microalghe è spesso limitata da eccessi di temperatura (Underwood 1984, Ruban and Horton 1995). Stress termici possono causare episodi di mortalità, in particolare nei cianobatteri, legati alla perdita di efficienza fotosintetica: il calore, infatti, può denaturare la ficobilina (pigmento fotosintetico) (Nakamoto et al. 2000) e alcune proteine coinvolte nella catena di trasporto degli elettroni (Havaux 1993). Tali risposte fisiologiche al calore possono spiegare la suscettibilità del MPB agli estremi di temperatura riscontrati nel presente lavoro di tesi, così come in alcuni studi correlativi. Ad esempio, in uno studio svolto da Jackson e coautori (2010), la concentrazione clorofilla *a* a livello dell'intertidale roccioso mostra un

andamento negativo in funzione dell'esposizione solare media giornaliera e della temperatura massima stagionale. Particolare importanza sembrava inoltre avere l'ampiezza dell'escursione termica giornaliera nel determinare la risposta dei microrganismi alla temperatura (Jackson et al. 2010).

Dal momento che estremi di sedimento e temperatura hanno determinato riduzioni di biomassa di MPB comparabili, l'ipotesi che prevedeva una gerarchia negli effetti non è stata supportata. È emersa invece l'importanza del grado di aggregazione temporale dei due estremi, nonostante dall'analisi dei dati relativi alle date di campionamento effettuate dopo entrambi i trattamenti per le due ripetizioni dell'esperimento siano emersi risultati discordanti. Nella prima ripetizione, l'applicazione ravvicinata dei due eventi estremi ha causato gli effetti più severi sulla biomassa del MPB dopo circa 40 giorni dall'applicazione dei trattamenti. Tuttavia, l'andamento temporale della biomassa dei *plot* che hanno subito i due eventi estremi isolati mostra un declino più marcato rispetto a quella dei *plot* interessati dai due eventi ravvicinati, nonostante il medesimo *trend* si osservi anche nei controlli. Nella seconda ripetizione, al contrario, dopo circa 50 giorni dai trattamenti, la biomassa del MPB ha subito una riduzione più drastica nelle unità sperimentali sottoposte all'applicazione dei due eventi estremi isolati nel tempo. A seguito di ciò non stati riscontrate variazioni nell'andamento temporale della biomassa, se non una lieve tendenza all'aumento, sebbene non statisticamente significativa.

L'effetto più marcato dell'imposizione di due estremi vicini nel tempo, emerso nella prima ripetizione dell'esperimento al giorno 42, può essere spiegato dal fatto che al momento dell'applicazione del secondo evento, i popolamenti già impattati non abbiano avuto a disposizione tempo sufficiente per recuperare, cosa invece avvenuta nel caso delle unità sperimentali trattate separatamente nel tempo. L'effetto del grado di aggregazione temporale di più eventi di disturbo sembra dipendere, infatti, sia dall'entità del recupero a

seguito del primo evento (Benedetti-Checchi et al. 2006), sia dal tempo che intercorre tra un evento e l'altro (Mumby et al. 2011). Popolamenti resilienti, in grado di recuperare rapidamente a seguito di eventi di disturbo, sarebbero più suscettibili a perturbazioni ravvicinate nel tempo, al contrario di popolamenti con tassi di crescita inferiori, i quali risulterebbero generalmente più impattati da disturbi isolati nel tempo. Studi teorici volti ad analizzare gli effetti del grado aggregazione temporale di uragani sulle barriere coralline hanno confermato tali previsioni, evidenziando come questi popolamenti, caratterizzati da lenti tempi di crescita, siano maggiormente impattati da eventi di disturbo distanziati nel tempo (Mumby et al. 2011).

Nonostante si osservino andamenti temporali differenti in relazione alla natura dei due eventi e loro il grado di aggregazione temporale, è possibile notare che la biomassa nei *plot* trattati separatamente nel tempo mostra un decremento maggiore rispetto a quelli trattati in un intervallo di tempo minore. Tuttavia anche la biomassa nei controlli tende a declinare. Il declino generalizzato della biomassa del MPB nel sito di studio potrebbe essere legato all'avvicinarsi della stagione estiva, durante la quale le condizioni di maggiore essiccamento hanno sottoposto ad ulteriore stress i popolamento microfitobentonico (Thompson et al. 2004). È possibile, infine, che nei *plot* trattati in maniera ravvicinata nel tempo il calo successivo ai due eventi risulti meno marcato proprio perché la biomassa era già particolarmente bassa.

Nella seconda replicazione dell'esperimento, invece, i *plot* trattati separatamente nel tempo sono risultati più impattati rispetto agli altri. Il mancato recupero del biofilm nell'intervallo di tempo intercorso tra i due eventi separati nel tempo, può fornire una spiegazione ai risultati ottenuti in linea con quanto riportato in letteratura riguardo alla relazione tra tempi di recupero e distanza tra eventi di disturbo (vedi sopra). La possibile causa del rallentamento nel recupero del biofilm può essere l'elevata pressione di pascolo

esercitata dall'erbivoro *Melaraphe neritoides* (L.) durante il secondo esperimento. Nel 2013, infatti, il numero medio di littorine per *plot* durante tutta la durata dell'esperimento era di 1,78 individui. Al contrario, durante la seconda ripetizione dell'esperimento, il numero di littorine ha subito un sostanziale incremento nel sito di studio a circa 50 giorni dal primo dei due eventi separati nel tempo. Tale incremento è coinciso con una riduzione della biomassa del MPB, sia nei *plot* trattati sia nei controlli.

Successivamente, l'abbondanza delle littorine è risultata sistematicamente maggiore nelle unità sperimentali trattate separatamente nel tempo rispetto alle altre. Tale differenza nella pressione di pascolo può spiegare il successivo mantenimento delle differenze tra eventi vicini e lontani. A seguito del declino, tuttavia, è stato riscontrato, un aumento, sebbene non significativo, della biomassa nei *plot* trattati. Questi risultati sono concordi con quanto riportato in numerosi studi in cui è emerso come l'attività di erbivoria operata dalle littorine possa inizialmente provocare una riduzione della biomassa microalgale (Stafford & Davies 2005) e successivamente favorirne l'incremento, grazie alla rimozione di cellule morte e detrito che possono limitare la penetrazione della luce nel biofilm (Skov et al. 2010).

Le littorine costituiscono la fauna dominante nella fascia alta delle coste rocciose di tutto il mondo (Stephenson & Stephenson 1972, Reid 1996). Si tratta di organismi che, durante i periodi di emersione, formano aggregati, sia quando sono presenti crepe e fessure sugli scogli sia quando queste sono assenti (Emson & Faller-Fritsch 1976, Raffaelli & Hughes 1978, Garrity 1984, Britton et al. 1991, Chapman 1995, Chapman & Underwood 1996). Queste associazioni sembrano avere lo scopo di ridurre la disidratazione durante i periodi di emersione e ridurre il dislocamento dovuto al moto ondoso (Raffaelli & Hughes 1976, Garrity 1984, Chapman & Underwood 1996). La motilità di questi erbivori è molto

variabile (Stafford & Davies 2005) ed i periodi di foraggiamento sembrano essere limitati dai periodi di emersione e influenzati dal moto ondoso (Little 1989, Stafford 2002).

Numerosi studi evidenziano come l'erbivoria, nella fascia più alta dell'intertidale roccioso, possa avere un ruolo significativo nel controllo del MPB epilitico (Nicotri, 1977; Branch & Branch, 1981; Mak & Williams, 1999; Kaehler & Froneman, 2002; Thompson et al., 2004). In alcuni casi, gli effetti di questo fenomeno si riscontrano solo in aree ristrette intorno agli aggregati di littorine (Inghilterra nord orientale, Stafford & Davies 2005) formando aloni ben visibili (Skov et al. 2011), mentre, nelle aree tropicali sembrano esercitare un controllo più esteso sul MPB, influenzandone il limite di distribuzione superiore (Hong Kong, Mak & Williams 1999). Nel presente lavoro di tesi è emerso che una intensa attività di pascolo ad opera di questi erbivori, rallentando i tempi di recupero della biomassa del MPB, può modificare il grado di suscettibilità di tali popolamenti al grado di aggregazione temporale di eventi di disturbo estremi.

In conclusione, i risultati di tale studio forniscono evidenza empirica della maggiore suscettibilità di popolamenti con elevati tassi di crescita all'aumento nella frequenza e nel grado di aggregazione temporale di eventi estremi e mostrano come, tuttavia, le risposte a tali cambiamenti nella distribuzione temporale degli eventi di disturbo possano essere modulate da fattori biotici.

BIBLIOGRAFIA

- Agricultural Camera User's Guide 2010. Documentation Copyright 2010 Tetracam Inc, 21601 Devonshire Street Suite 310 Chatsworth, CA 91311 USA.
- Airolidi L., 2003. The effects of sedimentation on rocky coast assemblages. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 41: 161-236.
- Alexander, L.V., X. Zhang, T.C. Peterson, J. Caesar, B. Gleason, A.M.G. Klein Tank, M. Haylock, D. Collins, B. Trewin, F. Rahimzadeh, A. Tagipour, K.R. Kumar, J. Revadekar, G. Griffiths, L. Vincent, D.B. Stephenson, J. Burn, E. Aguilar, M. Brunet, M. Taylor, M. New, P. Zhai, M. Rusticucci, and J.L. Vazquez-Aguirre, 2006: Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation. *Journal of Geophysical Research – Atmospheres*, 111, D05109.
- Bartholy, J., and R. Pongracz, 2007: Regional analysis of extreme temperature and precipitation indices for the Carpathian Basin from 1946 to 2001. *Global and Planetary Change*, 57, 83-95.
- Benedetti-Cecchi L., Bertocci J., Vaselli S., Maggi E., 2006. Temporal variance reverse the impact of high mean intensity of stress in climate change experiment. *Ecology*, 87(10), pp. 2489–2499.
- Bjerke J.W., S. Bokhorst, M. Zielke, T.V. Callaghan, F.W. Bowles and G.K. Phoenix, 2011. Contrasting sensitivity of extreme winter warming events of dominant sub-Arctic heatland bryophyte and lichen species. *Journal of Ecology* 99: 1481-1488.
- Blake, R. E. and Duffy, J. E. (2010), Grazer diversity affects resistance to multiple stressors in an experimental seagrass ecosystem. *Oikos*, 119: 1625–1635. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18419.
- Branch, G. M. & M. L. Branch, 1981. Experimental analysis of intraspecific competition in an intertidal gastropod, *Littorina unifasciata*. *Australian Journal Marine and Freshwater Research* 32: 573–589.
- Camuffo, D., C. Bertolin, M. Barriandos, F. Dominguez-Castro, C. Cocheo, S. Enzi, M.

- Cazenave, A., Nerem R.S., 2004: Present-day sea level change: Observations and causes. Reviews of Geophysics DOI: 10.1029/2003RG000139
- Chapman MG (1995) Aggregation of the littorinid snail *Littorina unifasciata* in New South Wales, Australia. Mar Ecol Prog Ser 126:191–202
- Chapman MG, Underwood AJ (1996) Influences of tidal conditions, temperature and desiccation on patterns of aggregation of the high-shore periwinkle *Littorina unifasciata* in New South Wales, Australia. J Exp Mar Biol Ecol 196: 213–237
- Cooter, E., and S. LeDuc, 1995: Recent frost date trends in the northeastern United States. Int. J. Climatol., 15, 65–75.
- Corti, T., V. Muccione, P. Köllner-Heck, D. Bresch, and S.I. Seneviratne, 2009: Simulating past droughts and associated building damages in France. Hydrology and Earth System Sciences, 13(9), 1739-1747.
- Dai, A., 2011: Drought under global warming: a review. Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change, 2(1), 45-65.
- Dal Bello M., Maggi E., Rindi L., Capocchi A., Fontanini D., Sanz-Lazaro C. and Benedetti-Cecchi L., 2015. Multifractal spatial distribution of epilithic microphytobenthos on a Mediterranean rocky shore. In press Oikos 000: 001–009.
- Davies MS, Hawkins SJ, Jones HD (1992) Pedal mucus and its influence on the microbial food- supply of 2 intertidal gas- tropods, *Patella vulgate* L and *Littorina littorea* (L). J Exp Mar Biol Ecol. 161: 57–77.
- Dobkin, D. S., I. Olivieri, and P. R. Ehrlich, 1987: Rainfall and the interaction of microclimate with larval resources in the population dynamics of checkerspot butterflies (*Euphydryas editha*) inhabiting serpentine grassland. *Oecologia*, **71**, 161–166.
- Dobkin, D.S. et al. 1987. Rainfall and the interaction of microclimate on larval resources in the population dynamics of checkerspot butterflies (*Euphydryas editha*) inhabiting serpentine grassland. *Oecologia* 71: 161-166.

- Easterling DR, Evans JL, Groisman PY, et al. 2000. Observed variability and trends in extreme climate events: a brief review. *B Am Meteorol Soc* 81: 417–25.
- Ehrlich, P.R. et al. 1980. Extinction, reduction, stability and increase: The responses of checkerspot butterfly (*Euphydryas editha*) population to California drought. *Oecologia* 46: 101-105.
- Emson RH, Faller-Fritsch RJ (1976) An experimental investigation into the effect of crevice availability on abundance and size structure in a population of *Littorina rudis*: Gastropoda; Prosobranchia. *J Exp Mar Biol Ecol* 23:285–297
- Garrrity SD (1984) Some adaptations of gastropods to physical stress on a tropical rocky shore. *Ecology* 65:559–574
- Giannakopoulos, C., P. Le Sager, M. Bindi, M. Moriondo, E. Kostopoulou, and C.M. Goodess, 2009: Climatic changes and associated impacts in the Mediterranean resulting from a 2°C global warming. *Global and Planetary Change*, 68(3), 209-224.
- Groisman, P. Ya., and Coauthors, 1999: Changes in the probability of heavy precipitation: Important indicators of climatic change. *Climatic Change*, 42, 243–283.
- Gutschick, V.P. & BassiriRad, H. (2003) Extreme events as shaping physiology, ecology, and evolution of plants: toward a unified definition and evaluation of their consequences. *New Phytologist*, 160, 21–42.
- Havaux M.. Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves. *Plant Sci.*, 94:19–33, 1993.
- P. R. Ehrlich, P.R., Murphy, D.D., Singer, M. C., Sherwood, C. B., White, R.R., Brown, I.L., 1980: Extinction, reduction, stability and increase: The responses of checkerspot butterfly (*Euphydryas*) populations to the California drought. *Oecologia* July 1980, Volume 46, Issue 1, pp 101-105
- Heino, R., and Coauthors, 1999: Progress in the study of climate extremes in northern and central Europe. *Climatic Change*, 42, 151–181.

- Hill AS, Hawkins SJ (1991) Seasonal and spatial variation of epilithic microalgae distribution and abundance and its ingestion by *Patella vulgate* on a moderately exposed rocky shore. *J Mar Biol Assoc UK*. 71: 403–423.
- Hillebrand H, Worm B, Lotze HK (2000) Marine microbenthic community structure regulated by nitrogen loading and grazing pressure. *Mar Ecol Prog Ser*. 204: 27–38.
- Hjelle B and Glass GE. 2000. Outbreak of hantavirus infection in the four corners region of the United States in the wake of the 1997–1998 El Niño southern oscillation. *J Infect Dis* **181**: 1569–73.
- IPCC (2007-05-04). "Summary for Policymakers" ([http:// www. ipcc. ch/ pdf/ assessment-report/ ar4/ wg1/ ar4-wg1-spm. pdf](http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg1/ar4-wg1-spm.pdf)) (PDF). Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Retrieved 2009-07-03.
- Jackson AC, Underwood AJ, Murphy RJ, Skilleter GA (2010) Latitudinal and environmental patterns in abundance and composition of epilithic microphytobenthos. *Mar Ecol Prog Ser*. 417: 27-3.
- Jackson, A. C. et al. 2013. Biofilms on rocky shores: influence of rockpools, local moisture and temperature. – *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 443: 46 – 55.
- Jentsch A., J. Kreyling and C. Beierkuhnlein, 2007. A new generation of climate change experiments: events, not trends. *Frontiers in Ecology and Environment* 5(6): 315-324.
- Jenkins S.R., Hartnoll, R.G., 2001: Food supply, grazing activity and growth rate in the limpet *Patella vulgata* L.: a comparison between exposed and sheltered shores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. doi:10.1016/S0022-0981(01)00211-8
- Jordan CF (1969) Derivation of leaf area index from quality of light on the forest floor. *Ecology*. 50: 663-666.
- Kaehler S, Froneman PW(2002) Herbivore-mediated increase in the photosynthetic capacity of marine biofilms: indirect effects of changing microalgal assemblage composition. *Mar Ecol Prog Ser*. 234:15–22.

- Kaehler, S. & P. W. Froneman, 2002. Herbivore-mediated increase in the photosynthetic capacity of marine biofilms: indirect effects of changing microalgal assemblage composition. *Marine Ecology Progress Series* 234: 15–22.
- Karl, T. R., and R. W. Knight, 1998: Secular trends of precipitation amount, frequency, and intensity in the United States. *Bull. Amer. Meteor. Soc.*, 79, 1107–1119.
- Keough, M. J., Raimondi, P.T., 1995: Responses of settling invertebrate larvae to bioorganic films: Effects of large-scale variation in films. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. doi:10.1016/S0022-0981(96)02632-9
- Kuglitsch, F.G., A. Toret, E. Xoplaki, P.M. Della-Marta, J. Luterbacher, and H. Wanner, 2009: Homogenization of daily maximum temperature series in the Mediterranean. *Journal of Geophysical Research – Atmospheres*, 114, D15108.
- Kunkel, K.E., P.D. Bromirski, H.E. Brooks, T. Cavazos, A.V. Douglas, D.R. Easterling, K.A. Emanuel, P.Y. Groisman, G.J. Holland, T.R. Knutson, J.P. Kossin, P.D. Komar, D.H. Levinson, and R.L. Smith, 2008: Observed changes in weather and climate extremes. In: *Weather and Climate Extremes in a Changing Climate. Regions of Focus: North America, Hawaii, Caribbean, and U.S. Pacific Islands*. [Karl, T.R., G.A. Meehl, D.M. Christopher, S.J. Hassol, A.M. Waple, and W.L. Murray (eds.)]. A Report by the U.S. Climate Change Science Program and the Subcommittee on Global Change Research, Washington, DC, pp. 222.
- Levitus, S., J. Antonov, and T. Boyer (2005), Warming of the world ocean, 1955–2003, *Geophys. Res. Lett.*, 32, L02604, doi:10.1029/2004GL021592.
- Little C (1989) Factors governing patterns of foraging activity in littoral marine herbivorous molluscs. *J Molluscan Stud* 55:273–284
- MacIntyre HI, Geider RJ, Miller DC, (1996) Microphytobenthos: the ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries*. 19: 186-201.
- MacIntyre HI, Geider RJ, Miller DC, (1996) Microphytobenthos: the ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries*. 19: 186-201.
- Mak YM, Williams GA (1999) Littorinids control high inter-tidal biofilm abundance on tropical, Hong Kong rocky shores. *J Exp Mar Biol Ecol*. 233: 81–94.

- Mak, Y. M. & G. A. Williams, 1999. Littorinids control high intertidal biofilm abundance on tropical Hong Kong rocky shores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 223: 81–94.
- Meisner A., G.B. De Deyn, W. De Boer and W.H. van der Putten, 2013. Soil biotic legacy effects of extreme weather events influence plant invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(24): 9835-9838.
- Min S-K, X. Zhang, F.W. Zwiers and G.C. Hegerl, 2011. Human contribution to more-intense precipitation extremes. *Nature* 470: 378-381.
- Moberg, A., P.D. Jones, D. Lister, A. Walther, M. Brunet, J. Jacobeit, L.V. Alexander, P.M. Della-Marta, J. Luterbacher, P. Yiou, D. Chen, A.M.G.K. Tank, O. Saladie, J. Sigro, E. Aguilar, H. Alexandersson, C. Almarza, I. Auer, M. Barriendos, M. Begert, H. Bergstroem, R. Boehm, C.J. Butler, J. Caesar, A. Drebs, D. Founda, F.-W. Gerstengarbe, G. Micela, M. Maugeri, H. Osterle, K. Pandzic, M. Petrakis, L. Srnec, R. Tolasz, H. Tuomenvirta, P.C. Werner, H. Linderholm, A. Philipp, H. Wanner, and E. Xoplaki, 2006: Indices for daily temperature and precipitation extremes in Europe analyzed for the period 1901-2000. *Journal of Geophysical Research – Atmospheres*, 111, D22106.
- Mumby P.J., Vitolo R., Stephenson D.B., 2011. Temporal clustering of tropical cyclones and its ecosystem impacts. *PNAS*. 17626–17630
- Murphy, D. D., and R. R. White, 1984: Rainfall, resources, and dispersal in southern populations of *Euphydryas editha* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Pan-Pacific Entom.*, **60**, 350–354.
- Murphy, R. J. et al. 2006. Quantitative imaging to measure photosynthetic biomass on an intertidal rock platform. – *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312: 45–55.
- Murphy, R. J. et al. 2008. Field-based remote – sensing for experimental intertidal ecology: case studies using hyperspatial and hyperspectral data for New South Wales (Australia).– *Remote Sens. Environ.* 112: 3353 – 3365.
- Murphy, R. J. et al. 2009. Field-based remote sensing of intertidal epilithic chlorophyll: techniques using specialized and conventional cameras. – *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 380: 68 – 76.

- Nicotri, M. E., 1977. Grazing effects of four marine intertidal herbivores on the microflora. *Ecology* 58: 1020–1032.
- Osborn, T. J., M. Hulme, P. D. Jones, and T. A. Basnett, 1999: Observed trends in the daily intensity of United Kingdom precipitation. *Int. J. Climatol.*, in press.
- Parmesan C., T.L. Root and M.R. Willig, 2000. Impacts of Extreme Weather and Climate on Terrestrial Biota. *Bulletin of the American Meteorological Society* 81(3): 443–450.
- Pinheiro, J.C., and Bates, D.M. (2000) "Mixed-Effects Models in S and S-PLUS", Springer.
- Plagáí ÉE, Branch GM (2000) Does the limpet *Patella cochlear* fertilize its own algal garden? *Mar Ecol Prog Ser.* 194: 113–122.
- Plummer, N., and Coauthors, 1999: Changes in climate extremes over the Australian region and New Zealand during the twentieth century. *Climatic Change*, 42, 183–202.
- Potts, M. 1999. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria.– *Eur. J. Phycol.* 34: 319 – 328.
- Raffaelli DG, Hughes RN (1978) The effects of crevice size and availability on populations of *Littorina rudis* and *Littorina neritoides*. *J Anim Ecol* 47:71–83
- Reid DG (1996) Systematics and evolution of *Littorina*. The Ray Society, London
- Scheffer M. and S.R. Carpenter, 2003. Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 648–656.
- Sghedoni, A. della Valle, E. Garnier, M.J. Alcoforado, E. Xoplaki, J. Luterbacher, N. Diodato, M. Maugeri, M.F. Nunes, and R. Rodriguez, 2010: 500-year temperature reconstruction in the Mediterranean Basin by means of documentary data and instrumental observations. *Climatic Change*, 101(1-2), 169–199.
- Singer M.C. and C.D. Thomas, 1996. Evolutionary responses of a butterfly metapopulation to human and climate-caused environmental variation. *American Naturalist* 148: S9–S39.
- Singer, M. C., and P. R. Ehrlich, 1979: Population dynamics of the checkerspot butterfly *Euphydryas editha*. *Fortschr. Zool.*, **25**, 53–60.

- Skov, M. W. et al. 2010. Past and present grazing boosts the photo-autotrophic biomass of biofilms. – Mar. Ecol. Prog. Ser. 401: 101–111.
- Smith M.D., 2011. An ecological perspective on extreme climatic events: a synthetic definition and framework to guide future research. *Journal of Ecology* 99: 656–663.
- Smith, M.D. (2011) An ecological perspective on extreme climatic events: a synthetic definition and framework to guide future research. *Journal of Ecology*, 99, 656–663.
- Stafford R (2002) The role of environmental stress and physical and biological interactions on the ecology of high shore littorinids in a temperate and a tropical region. PhD thesis, University of Sunderland
- Stafford R, Davies MS (2005a) Spatial patchiness of epilithic biofilm caused by refuge-inhabiting high shore gastropods. *Hydrobiologia* 545:279–287
- Stal L.J..1995. *New Phytol.*,131:132,Tansley Review n.84. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities.
- Stevenson TA, Stevenson A (1972) Life between tidemarks on rocky shores. WH Freeman, New York, NY
- Suppiah, R., and K. Hennessy, 1998: Trends in seasonal rainfall, heavy rain-days, and number of dry days in Australia 1910– 1990. *Int. J. Climatol.*, 18, 1141–1155.
- Tarhule, S., and M. Woo, 1998: Changes in rainfall characteristics in northern Nigeria. *Int. J. Climatol.*, 18, 1261–1272.
- Thompson R.C., T.A. Norton, S.J. Hawkins, 2004. Physical stress and biological control regulate the producer–consumer balance in intertidal biofilms. *Ecology* 85: 1372–1382
- Thompson RC, Hawkins SJ, Norton TA (1998) The influence of epilithic microbial films on the settlement of *Semibalanus balanoides* cyprids a comparison between laboratory and field experiments. *Hydrobiologia*. 376: 203–216.
- Thompson RC, Moschella P. S., Jenkins SR, Norton TA, Hawkins SJ (2005) Differences in photosynthetic marine biofilms between sheltered and moderately exposed rocky shores. *Mar Ecol Prog Ser*. 296: 53–63.

- Thompson, R. C. et al. 1999. Problems in extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll from epilithic microbial biofilms: towards a standard method. – J. Mar. Biol. Ass. UK 79: 551 – 558.
- Underwood AJ (1984a): The vertical-distribution and seasonal abundance of intertidal microalgae on a rocky shore in New South Wales. J Exp Mar Biol Ecol. 78: 199–220.
- Underwood, A. J., 1980: The effects of grazing by gastropods and physical factors on the upper limits of distribution of intertidal macroalgae. *Oecologia* . DOI: 10.1007/BF00540127.
- Van Peer L., I. Nijs, D. Reheul and B. De Cauwer, 2004. Species richness and susceptibility to heat and drought extremes in synthesized grassland ecosystems: compositional vs physiological effects. *Functional Ecology* 18: 769-778.
- Wei W., L. Chen and B. Fu, 2009. Effects of rainfall change on water erosion processes in terrestrial ecosystems. *Progress in Physical Geography* 33(3): 207-318.
- Wieczorek, S.K., Todd, C.D., 1998: Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. DOI: 10.1080/08927019809378348.
- Yallop ML, Winder BD, Paterson DM, Stal LJ (1994) Comparative structure, primary production and biogenic stabilization of cohesive and noncohesive marine sediments inhabited by microphytobenthos. *Estuar Coast Shelf Sci.* 39: 565 – 582.
- Zhai, P. M., and R. E. Eskridge, 1997: Atmospheric water vapor over China. *J. Climate*, 10, 2643–2652.
- Zhang, X.D., A. Sorteberg, J. Zhang, R. Gerdes, and J.C. Comiso, 2008: Recent radical shifts of atmospheric circulations and rapid changes in Arctic climate system. *Geophysical Research Letters*, 35, L22701.